

**Vergleich verschiedener Lokalisationen zum
Nachweis von feline Herpesvirus-1, feline
Calicivirus und *Chlamydia felis* bei Katzen mit
Katzenschnupfen mittels Polymerase-Kettenreaktion**

von Catharina Schulz

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Vergleich verschiedener Lokalisationen zum Nachweis von
felinem Herpesvirus-1, felinem Calicivirus und
Chlamydia felis bei Katzen mit Katzenschnupfen mittels
Polymerase-Kettenreaktion**

von Catharina Schulz

aus

Lörrach

München 2015

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl: Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Mitbetreuung durch: Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil. Bianka Schulz

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Univ.-Prof. Dr. Lutz S. Göhring

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

In Liebe und Dankbarkeit

Meiner Familie,

Meinem Freund

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|--|-----------|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | LITERATURÜBERSICHT | 2 |
| 1. | Klinik und Diagnostik der feline Herpesvirusinfektion | 2 |
| 1.1. | Klinische Symptome | 2 |
| 1.2. | Indirekte Nachweisverfahren | 4 |
| 1.2.1. | Bedeutung von Antikörpern | 4 |
| 1.2.2. | Prävalenz | 6 |
| 1.2.3. | Vorhersage eines Schutzes | 7 |
| 1.2.4. | Tests..... | 8 |
| 1.2.4.1. | Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) | 8 |
| 1.2.4.2. | Serumneutralisationstest (SNT) | 9 |
| 1.2.4.3. | Hämagglutinationhemmungstest (HAH)..... | 9 |
| 1.3. | Direkte Nachweisverfahren | 10 |
| 1.3.1. | Prävalenz | 10 |
| 1.3.2. | Tests..... | 12 |
| 1.3.2.1. | Virusisolierung (VI) | 12 |
| 1.3.2.2. | Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) | 13 |
| 1.3.2.3. | Immunfluoreszenz von Direktausstrichen (IFT) | 13 |
| 1.3.2.4. | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 14 |
| 2. | Klinik und Diagnostik der feline Calicivirusinfektion..... | 15 |
| 2.1. | Klinische Symptome | 16 |
| 2.2. | Indirekte Nachweisverfahren | 18 |
| 2.2.1. | Bedeutung von Antikörpern | 18 |
| 2.2.2. | Prävalenz | 19 |
| 2.2.3. | Vorhersage eines Schutzes | 19 |
| 2.2.4. | Tests..... | 21 |
| 2.2.4.1. | Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) | 21 |
| 2.2.4.2. | Serumneutralisationstest (SNT) | 21 |
| 2.2.4.3. | Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) | 22 |
| 2.3. | Direkte Nachweisverfahren | 22 |
| 2.3.1. | Prävalenz | 22 |
| 2.3.2. | Tests..... | 23 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 2.3.2.1. | Virusisolierung (VI) | 24 |
| 2.3.2.2. | Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) | 24 |
| 2.3.2.3. | Direkter Immunfluoreszenztest (IFT) | 24 |
| 2.3.2.4. | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 25 |
| 3. | Klinik und Diagnostik der <i>Chlamydia-felis</i>-Infektion | 26 |
| 3.1. | Klinische Symptome | 26 |
| 3.2. | Indirekte Nachweisverfahren | 29 |
| 3.2.1. | Bedeutung von Antikörpern | 29 |
| 3.2.2. | Prävalenz | 30 |
| 3.2.3. | Vorhersage eines Schutzes | 32 |
| 3.2.4. | Tests..... | 33 |
| 3.2.4.1. | Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) | 33 |
| 3.2.4.2. | Western blot (Immunoblot) | 34 |
| 3.2.4.3. | Komplementbindungsreaktion (KBR) | 34 |
| 3.2.4.4. | Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) | 35 |
| 3.3. | Direkte Nachweisverfahren | 35 |
| 3.3.1. | Prävalenz | 35 |
| 3.3.2. | Tests..... | 37 |
| 3.3.2.1. | Direktausstriche | 37 |
| 3.3.2.2. | Immunfluoreszenz von Direktausstrichen (IFT) | 38 |
| 3.3.2.3. | Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) | 38 |
| 3.3.2.4. | Kultureller Nachweis..... | 39 |
| 3.3.2.5. | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 39 |
| III. | VERÖFFENTLICHUNG | 42 |
| IV. | DISKUSSION | 50 |
| V. | ZUSAMMENFASSUNG..... | 59 |
| VI. | SUMMARY | 60 |
| VII. | LITERATURVERZEICHNIS | 61 |
| VIII. | ANHANG | 87 |
| IX. | DANKSAGUNG | 89 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | | | |
|-----------------------|--|--------|--|
| Abb. | Abbildung | FHV-1 | Felines Herpesvirus-1 |
| AG | Antigen | FITC | Fluorescein- isothiocyanat |
| AK | Antikörper | FIV | felines Immundefizienz- virus |
| ca. | zirka | FRET | Förster- Resonanzenergie- Transfer |
| <i>C. felis</i> | <i>Chlamydia felis</i> | FURTD | feline upper respiratory tract disease |
| <i>C. psittaci</i> | <i>Chlamydia psittaci</i> | HA | Hämagglutinations- test |
| <i>C. trachomatis</i> | <i>Chlamydia trachomatis</i> | HAH | Hämagglutinations- hemmungstest |
| cpE | Cytopathischer Effekt | HSV-1 | Herpes-simplex- Virus-1 |
| CrFK | Crandell-Reeses feline kidney cells | IgG | Immunglobulin G |
| DNA | Desoxyribonuclein- säure | KBR | Komplement- bindungsreaktion |
| EK | Elementarkörper | k. PCR | konventionelle PCR |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay | LATs | Latenz-assoziierte- Transkripte |
| et al. | <i>et alii</i> | | |
| FCV | felines Calicivirus | | |
| FCV-VSD | FCV-associated virulent systemic disease | | |
| FeLV | felines Leukämievirus | | |

| | | | |
|-------------|--|--------|-----------------------------|
| LPS-Antigen | Lipopolysaccharid-Antigen | | neutralisationstest |
| | | SPF | spezifisch |
| LPGS | lymphozytäre/ plasmazytäre Gingivostomatitis | | pathogenfrei |
| | | spp. | spezies |
| MOMPs | major outer membrane proteins | Tab. | Tabelle |
| | | TK-Gen | Thymidinkinase- Gen |
| n. PCR | nested-PCR | | |
| ompA | outer membrane protein A | USA | United States of America |
| ORF | open reading frame | VI | Virusisolierung |
| PBSS | phosphate buffered saline solution | VP | virales Protein |
| | | z. B. | zum Beispiel |
| PCR | Polymerase- Kettenreaktion | | |
| pgp3 | Plasmid-Protein 3 | | |
| POMPs | polymorphic outer membrane proteins | | |
| q-PCR | quantitative Polymerase- Kettenreaktion | | |
| RK | Retikularkörper | | |
| RNA | Ribonukleinsäure | | |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase- Polymerase- Kettenreaktion | | |
| SNT | Serum- | | |

I. EINLEITUNG

Katzenschnupfen (feline upper respiratory tract disease = FURTD) ist eine weltweit verbreitete, hochkontagiöse Infektionskrankheit der Katze, die vor allem in Einrichtungen mit hoher Bestandsdichte häufig auftritt (DAWSON et al., 1994a). Das feline Herpesvirus-1 (FHV-1) und das feline Calicivirus (FCV) gelten als die zwei Haupterreger des Katzenschnupfenkomplexes (GASKELL, 1993; SYKES, 2001). Zudem können bakterielle Erreger wie *Chlamydia felis* (*C. felis*), *Bordetella bronchiseptica* und *Mycoplasma* speziees beteiligt sein (SYKES, 2014a).

Obwohl seit über 40 Jahren Impfprophylaxe betrieben wird, ist die Zahl der an FURTD erkrankten Katzen nicht zurückgegangen (HARBOUR et al., 1991; BINNS et al., 2000). Besonders in Tierheimen und Mehrkatzenhaushalten ist eine schnelle und sichere Diagnosestellung wichtig, um eine Übertragung auf andere Katzen zu verhindern, lange Aufenthalte im Tierheim zu vermeiden, Kosten für die Pflege zu minimieren und eine gezielte Therapie beginnen zu können (SATO et al., 1999; DINNAGE et al., 2009). Bisher ist unbekannt, welche Lokalisation zum Nachweis von FHV-1, FCV und *C. felis* am besten geeignet ist.

Ziel der vorliegenden Studie war es, eine geeignete Lokalisation für den Nachweis der drei Pathogene zu bestimmen. Zudem sollte der Zusammenhang zwischen klinischen Symptomen und der Nachweishäufigkeit der Erreger an den Lokalisationen untersucht werden. Im Rahmen der Untersuchung wurden FHV-1, FCV und *C. felis* an den vier Lokalisationen Rachen, Zunge, Nase und Konjunktiva mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen und die Nachweisraten der Erreger miteinander verglichen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Klinik und Diagnostik der felines Herpesvirusinfektion

FHV-1, ein behülltes Virus mit linearer doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (DNA) (MAEDA et al., 1998), untergliedert sich in verschiedene genetisch ähnliche Isolate, die aber dem gleichem Serotyp angehören (HAMANO et al., 2003). Aufgrund der geringen genetischen Varianz ist FHV-1 im Gegensatz zum FCV mittels direkter Nachweisverfahren, wie zum Beispiel der PCR, einfacher nachzuweisen. FHV-1 kann sowohl klinische Symptome des oberen Respirationstraktes als auch Konjunktivitis und ulzerative Keratokonjunktivitis auslösen (GASKELL et al., 2007). Charakteristisch ist die Entwicklung einer latenten Infektion (GASKELL et al., 1985).

1.1. Klinische Symptome

FHV-1 verursacht Entzündungen der Schleimhäute des oberen Respirationstrakts und der Augen (DAWSON et al., 1998) und kann zu schweren akuten Erkrankungen mit hoher Mortalitätsrate bei jungen Katzenwelpen führen (SYKES et al., 1997b). Die Ausprägung der Symptome ist dabei abhängig von dem Virusstamm, der Infektionsdosis, dem Alter und Immunstatus des Tieres und möglichen Sekundärinfektionen (DI MARTINO et al., 2007). Klinische Symptome treten nach einer Inkubationszeit von 24-48 Stunden auf und umfassen Apathie, Inappetenz, Fieber, Salivation, Niesen sowie Nasen- und Augenausfluss (CRANDELL & MAURER, 1958; BARTHOLOMEW & GILLESPIE, 1968; WEIGLER et al., 1997b). FHV-1 führt typischerweise zu schweren Symptomen im Bereich des oberen Respirationstraktes (ZICOLA et al., 2009). Selten kann bei FHV-1-infizierten Katzen Dyspnoe oder Husten beobachtet werden (POVEY & JOHNSON, 1971). Auch Ulzerationen im Rachen oder auf der Zunge mit starker Salivation können durch eine FHV-1-Infektion ausgelöst werden, treten aber selten auf (HARGIS & GINN, 1999). Untertemperatur bei Welpen begünstigt die Entstehung von lebensbedrohlichen Virämien (SYKES, 2014b).

In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass über 80 % der FHV-1-infizierten Katzen eine lebenslange latente Infektion entwickeln (GASKELL & POVEY, 1977). Aktuell wird davon ausgegangen, dass bei nahezu allen FHV-1-infizierten Katzen auf eine akute Infektion eine latente Infektion folgt (GASKELL et al., 2012; SYKES, 2014a). Zirka (ca.) 45 % der latent infizierten Katzen scheiden das Virus vier bis zwölf Tage nach Einfluss eines Stressfaktors erneut aus (GASKELL & POVEY, 1977; GASKELL et al., 2007). In den

meisten Fällen sind die klinischen Symptome einer FHV-1-Infektion innerhalb von zehn bis 14 Tagen selbstlimitierend (BISTNER et al., 1971; GASKELL et al., 2012). Eine chronische FHV-1-Infektion kann zu nekrotischen und osteolytischen Veränderungen der Nasenmuscheln führen und eine bakterielle Rhinosinusitis begünstigen (JOHNSON et al., 2005).

FHV-1 gilt als eine der häufigsten Ursachen für Konjunktivitis und Keratitis bei Katzen (ANDREW, 2001; LOW et al., 2007). Eine FHV-1-induzierte Konjunktivitis kann unter noch geschlossenen Lidern (*Ophthalmia neonatorum*) in den ersten vier Lebenswochen (neonatale Infektion), bis zum sechsten Lebensmonat (akutes respiratorisches Syndrom) sowie danach als rezidivierende und immunvermittelte Form auftreten (WALDE et al., 2008). Die klinischen Symptome einer FHV-1-induzierten Konjunktivitis variieren in ihrem Schweregrad und beinhalten Blepharospasmus, konjunktivale Hyperämie, Chemosis und serösen bis eitrigen Augenausfluss (GASKELL et al., 2007; HARTMANN et al., 2010). In schweren Fällen kann es zu einer Nekrose des konjunktivalen Epithels kommen und ein Symblepharon die Folge sein (RAMPAZZO et al., 2003). Augensymptome bei adulten FHV-1-infizierten Katzen sind meist das Resultat einer Reaktivierung des latenten Virus infolge von systemischer Immunsuppression, Stress oder Gabe von Kortikosteroiden (ANDREW, 2001). Chronische FHV-1-Infektionen verursachen vor allem unilaterale Augensymptome und reichen von einer milden Konjunktivitis bis zu Hornhautulzera, stromaler Keratitis, *Keratoconjunctivitis sicca*, Korneasequester und eosinophiler Keratitis (NASISSE, 1990; STILES, 1995, 2000; DEAN & MEUNIER, 2013). Eine stromale Keratitis wird vermutlich sekundär zu einer FHV-1-Infektion aufgrund einer immunmedierten Entzündungsreaktion hervorgerufen (SJODAHL-ESSEN et al., 2008). Die ulzerative Keratitis (Abbildung (Abb.) 1) ist durch dendritische Hornhautulzera charakterisiert, welche durch den zytopathischen Effekt des FHV-1 auf das Hornhautepithel hervorgerufen werden und als pathognomonisch für eine FHV-1-Infektion gelten (BISTNER et al., 1971; ROBERTS et al., 1972). Korneaperforationen und Hornhautvernarbungen können zur bakteriellen Sekundärbesiedelung und Erblindung führen. Hornhautsequester treten vor allem bei brachycephalen Rassen in Folge einer FHV-1-Infektion auf. Sie sind durch stromale Kollagendegeneration und Ablagerung von braunen Pigmenten charakterisiert (GOULD, 2011). Das FHV-1 konnte in einer Studie von NASISSE und Mitarbeitern (1989) bei Katzen mit Hornhautsequestern durch Tupferprobenentnahme aus dem Bindehautsack detektiert werden.

Bisher konnte keine Assoziation zwischen einer FHV-1-Infektion und einer chronischen

Gingivostomatitis nachgewiesen werden (HARBOUR et al., 1991; QUIMBY et al., 2008). Gelegentlich kann es bei jungen oder immunsupprimierten Katzen zu einer primären Pneumonie, einer generalisierten Infektion oder neurologischer Symptomatik mit hoher Mortalitätsrate kommen (GASKELL et al., 2012). Selten führt eine FHV-1-Infektion bei trächtigen Kätzinnen zu Aborten oder fetaler Resorption, wobei die Rolle des FHV-1 in der Pathogenese dieser klinischen Problematik noch nicht ausreichend geklärt ist (SYKES, 2014a). Oberflächliche Hautulzerationen, eine ulzerative Gesichtsdermatitis und akute Stomatitiden können ebenfalls bei einer FHV-1-Infektion beobachtet werden (HARGIS & GINN, 1999; BLOOM, 2006; HOLLAND et al., 2006).



Abb. 1: FHV-1-induzierte ulzerative Keratitis (GASKELL et al., 2012)

1.2. Indirekte Nachweisverfahren

Der indirekte Erregernachweis beruht auf dem Nachweis von erregerspezifischen Antikörpern (AK). Allen Verfahren liegt eine Antigen (AG)-AK-Reaktion zugrunde.

1.2.1. Bedeutung von Antikörpern

Der Nachweis von AK gegen FHV-1 kann nicht als diagnostische Bestätigung einer Infektion mit dem FHV-1 dienen. Ein positiver FHV-1-Antikörpernachweis kann durch eine Feldinfektion mit dem Virus hervorgerufen werden, bei Welpen durch maternale AK vorliegen oder durch eine vorausgegangene Impfung bedingt sein. Da FHV-1 nach einer

primären Infektion zu einer Latenzphase führen kann, können AK im Serum nur auf eine vorausgegangene Infektion hinweisen, korrelieren jedoch nicht mit einer klinischen Erkrankung (SATO et al., 1999).

Im Allgemeinen können nach einer Infektion mit zytopathischen Viren erstmals nach sechs bis 14 Tagen AK in ausreichender Höhe gemessen werden (PLANZ et al., 1996). Die Inkubationszeit einer FHV-1-Infektion beträgt drei bis sieben Tage (LINDT et al., 1965), sodass erste klinische Symptome meist während der Latenzphase der Immunantwort auftreten. In dieser Phase der Immunantwort wird das AG erkannt und B- und T-Zellen aktiviert (PARIJA, 2009). Die Bildung von AK findet zu diesem Zeitpunkt noch nicht statt, sodass trotz klinischer Symptome noch keine zirkulierenden AK nachweisbar sind. Eine Korrelation zwischen klinischen Symptomen und messbaren AK besteht daher oft nicht. Auch kann ein positiver Antikörperrnachweis keine Auskunft darüber geben, ob das Tier akut oder chronisch infiziert ist (MAGGS et al., 1999). In einer Studie von MAGGS und Mitarbeitern (2005a) konnte kein Unterschied in der AK-Prävalenz von FHV-1 zwischen gesunden Katzen und Katzen mit Verdacht auf Katzenschnupfen ermittelt werden.

Während lange Zeit angenommen wurde, dass die über das Kolostrum aufgenommenen maternalen AK, Welpen bis zur zehnten Lebenswoche vor einer FHV-1-Infektion schützen (GASKELL & POVEY, 1982), wurde mittlerweile nachgewiesen, dass 25 % der Katzen ab der sechsten Lebenswoche keine AK mehr aufweisen (DAWSON et al., 2001). Aufgrund des potentiellen Vorliegens von maternalen AK kann bei sehr jungen Welpen mit FURTD anhand des Antikörperspiegels keine Aussage über das Vorliegen einer FHV-1-Infektion getroffen werden (GASKELL et al., 2012). Auch nach einer Impfung mit Lebend- oder Totimpfstoffen sind AK nachweisbar (GASKELL et al., 2012). Mithilfe einer Antikörperbestimmung kann jedoch keine Unterscheidung zwischen einer Immunantwort auf eine vorausgegangene Impfung oder auf eine Feldinfektion erfolgen (MAGGS et al., 1999).

Allgemein stellt der Nachweis von AK eine Möglichkeit dar, um den aktuellen Immunstatus der Katze einschätzen zu können (LAPPIN et al., 2002). Alle Testverfahren zum Nachweis von FHV-1-AK können genutzt werden, um eine FHV-1-Exposition zu bestätigen; die Korrelation zwischen der Höhe des AK-Titers und dem Krankheitsbild ist aber gering (MAGGS et al., 1999). Daher kann die Höhe des AK-Titers allein keinesfalls als Maß für eine Immunität gegen Wiederholungsinfektionen angesehen werden. Dies bestätigt eine Studie von GASKELL und Mitarbeitern (1979), in welcher bei Katzen nach primärer Infektion keine Serumantikörper gemessen werden konnten, wobei diese trotzdem vor einer Zweitinfektion

geschützt waren. Manche Autoren empfehlen die Bestimmung eines AK-Titers bei Katzen in Mehrkatzenhaushalten, Tierheimen oder Tierpensionen, um den Immunstatus eines Tieres zu bestimmen und vor Aufnahme in eine Gruppenhaltung gegebenenfalls eine Immunisierung durchzuführen (DIGANGI et al., 2012). Zusammenfassend kann der AK-Nachweis aufgrund der genannten Nachteile nicht als diagnostisches Verfahren zum Nachweis der Erkrankung empfohlen werden.

1.2.2. Prävalenz

Die Prävalenz von AK gegen FHV-1 wurde bei Katzen mit Katzenschnupfensymptomen mit 62 bis 90 % angegeben (STUDDERT & MARTIN, 1970; POVEY & JOHNSON, 1971; LAZAROWICZ et al., 1982; MAGGS et al., 1999). Bei Katzen mit Augenproblemen konnten AK gegen FHV-1 bei 67 bis 93 % der Tiere detektiert werden (MAGGS et al., 1999). Dagegen wurde bei gesunden Katzen eine FHV-1-AK-Prävalenz von 19 bis 100 % nachgewiesen (LAZAROWICZ, 1977; YAGAMI et al., 1985; DAWSON et al., 1998; MAGGS et al., 1999). Alle Prävalenzdaten sind in Tabelle (Tab.) 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Prävalenz von Antikörpern gegen das feline Herpesvirus-1 in Katzenpopulationen (SNT = Serumneutralisationstest, HAH = Hämagglutinationshemmung, ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay)

| Nachweisverfahren | Prävalenz in % | Anzahl an Katzen | Population | Land | Autor |
|-------------------|----------------|------------------|---------------------------------------|----------------|--------------------------|
| ELISA | 100 | 17 | Gesunde Katzen | Großbritannien | Maggs et al. (1999) |
| | 88,2 | 38 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | | |
| | 97,3 | 46 | Katzen mit chronischen Augenproblemen | | |
| ELISA | 97,0 | 100 | Hauskatzen, unselektiert | USA | Dawson et al. (1998) |
| ELISA | 70,7 | 276 | Hauskatzen, unselektiert | USA | Lappin et al. (2002) |
| HA | 20,1 | 507 | Versuchskolonien, unselektiert | Japan | Yagami et al. (1985) |
| IFT | 68,9 | 17 | Gesunde Katzen | Großbritannien | Maggs et al. (1999) |
| | 62,5 | 38 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | | |
| | 63,6 | 46 | Katzen mit chronischen Augenproblemen | | |
| SNT | 19,0 | 92 | Gesunde Katzen | Schweiz | Lazarowicz et al. (1982) |
| | 89,5 | 108 | Katzen mit respiratorischen | | |

| | | | Symptomen | | |
|-----|--------------|------------|--|----------------|---------------------------|
| SNT | 76,5 52,4 | 328 164 | Versuchskolonien, unselektiert Hauskatzen, unselektiert | Großbritannien | Povey et al. (1971) |
| SNT | 50,0 | 45 | Unselektiert | Australien | Studdert et al. (1970) |
| SNT | 11,0 | 347 | Unselektiert | USA | DiGangi et al. (2012) |

1.2.3. Vorhersage eines Schutzes

Nach einer Exposition mit FHV-1 können bei manchen Katzen im Serum neutralisierende AK nachgewiesen werden. Die zellvermittelte Immunantwort ist jedoch bei Infektionen mit FHV-1 wahrscheinlich die wichtigere Schutzfunktion verglichen mit der humoralen Abwehr (GASKELL et al., 2012). Da sich FHV-1 intrazellulär vermehrt und nach der Reifung direkt in die benachbarten Epithelzellen gelangt, ist die Wirtsabwehr durch zirkulierende AK relativ unwirksam. So können auch Katzen trotz maternaler AK oder regelmäßiger Impfung Virusträger sein. Allgemein lässt sich für FHV-1 daher mittels Bestimmung der Serum-AK keine sichere Aussage über Immunstatus des Tieres und Schutz vor einer Infektion treffen, da sowohl Katzen mit einem negativen AK-Titer vor einer Infektion geschützt sein können als auch Katzen mit einem positiven AK-Titer klinische Symptome nach einer Infektion entwickeln können (BISTNER et al., 1971; SYKES, 2014a). Nach einer akuten primären Infektion zeigen die Katzen meist nur einen niedrigen oder nicht messbaren Antikörpertiter (MAGGS, 2005a). Auch bei experimentell infizierten Katzen konnten meist nur relativ niedrige AK-Titer zwischen 1:4 und 1:64 detektiert werden (CRANDELL et al., 1961; WALTON & GILLESPIE, 1970). Erst nach wiederholter Exposition oder Reaktivierung des Virus bei latent infizierten Katzen steigen die AK auf ein moderates Level an und bleiben, unabhängig von viralen Ausscheidungsepisoden, danach relativ stabil (GASKELL et al., 2007). Generell können trotzdem bei Katzen mit messbaren AK nach einer wiederholten Infektion milde Symptome und eine Virusausscheidung beobachtet werden (MAEDA et al., 1998; THIRY et al., 2009). Daraus kann geschlossen werden, dass nicht die AK alleine entscheidend für die Verhinderung einer klinischen Erkrankung sind, sondern auch der zellulären Immunität eine wichtige Rolle hierbei zufällt (LAPPIN et al., 2002). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass nach einer Impfung bei Katzen 36 bis 48 Monate lang AK nachgewiesen werden können (SCOTT & GEISSINGER, 1999; MOUZIN et al., 2004). Innerhalb dieser Zeit konnten bei Katzen nach Infektion mit einem virulenten FHV-1 mildere Symptome als bei nicht geimpften Katzen ausgelöst werden, sodass eine Impfung vor einer

schweren klinischen Erkrankung zu schützen scheint (STILES, 2003).

In einer Studie, in welcher die protektive Wirkung von maternalen AK untersucht wurde, konnte keine Korrelation zwischen den vor Geburt bestimmten AK-Titern bei den Kätzinnen und den Titern, die innerhalb der ersten Lebenswoche bei deren Welpen erhoben wurden, festgestellt werden. Zwei Katzenwelpen zeigten nach Übertragung von FHV-1 *post partum* nur ein niedriges Level an maternalen AK, schieden das Virus über mehrere Wochen aus, entwickelten aber keine klinischen Symptome (GASKELL & POVEY, 1982). Nur bei einer Kätzin die *prae partum* mit 1:512 den höchsten Titer aufwies, konnte eine Korrelation festgestellt werden, da ihre Welpen die höchsten und am längsten anhaltenden Titer aufwiesen (GASKELL & POVEY, 1982). Anhand von maternale AK kann somit auch keine sichere Aussage über den Schutz vor einer Erkrankung getroffen werden.

1.2.4. Tests

Als indirekte Verfahren zum Nachweis von FHV-1 eignen sich ELISA, Hämagglutinationshemmungstest (HAH) und Serumneutralisationstest (SNT) (LAPPIN et al., 2002). Diese Nachweismethoden werden aufgrund der geringen Korrelation zwischen der Höhe des AK-Titers und dem Krankheitsbild nicht zur Diagnosestellung einer FHV-1-Infektion empfohlen (SYKES, 2014a).

1.2.4.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

DAWSON und Mitarbeiter (1998) entwickelten einen indirekten ELISA zur Bestimmung von AK gegen FHV-1-AG im Serum, im Kammerwasser und im Liquor. Neben der zu analysierenden Probe und dem AG wird für die Durchführung eines ELISA-Testes eine Mikrotiterplatte als Trägermaterial sowie ein Lesegerät und ein ELISA-Reader benötigt (REINARD, 2010b). Die Kavitäten einer 96-Loch-Mikrotiterplatte werden zunächst mit dem verdünnten FHV-1-AG beschichtet und die Serumproben mit einer Pufferlösung (phosphate-buffered saline solution = PBSS) (SATO et al., 1999) inkubiert. Nach Inkubation wird ein enzymgebundener Sekundäntikörper (z. B. Peroxidase-konjugiertes Immunglobulin (Ig) G), welcher gegen den gesuchten AK gerichtet ist, in die Kavitäten hinzugegeben (BÜTTNER, 2007). Nach einer einstündigen Inkubationszeit wird die Farbreaktion mit Phosphorsäure gestoppt. Die Ergebnisse des ELISA können durch die Messung des Absorptionsgrades mittels Spektrophotometer quantifiziert werden (DAWSON et al., 1998). Der indirekte ELISA ist technisch wenig kompliziert, kann standardisiert in vielen Labors genutzt und an den Gebrauch in Tierkliniken angepasst werden (LAPPIN et al., 2002). Weiterhin wurde ein Radioimmuntest mit radioaktiv markiertem AG zum Nachweis von

FHV-1-AK etabliert. Dieser modifizierte ELISA stellt aufgrund seiner hohen Sensitivität und den geringen labortechnischen Anforderungen eine geeignete Alternative zum herkömmlichen ELISA dar (SATO et al., 1999). Der indirekte ELISA Test ist im Vergleich zum SNT und HAH eine sensitivere Methode, um spezifische AK gegen das FHV-1 nachzuweisen (DAWSON et al., 1998). In einer Studie von DIGANGI und Mitarbeitern (2011) konnte für einen indirekten ELISA-Schnelltest eine Sensitivität von 91 % und eine Spezifität von 97 % ermittelt werden.

1.2.4.2. Serumneutralisationstest (SNT)

AK gegen das FHV-1 können auch mit Hilfe des SNT nachgewiesen werden (POVEY & JOHNSON, 1969a, 1971; DAWSON et al., 1998; SATO et al., 1999). Wird der schädigende zytopathische Effekt (cpE) des FHV-1 in Zellkulturen durch die im Serum enthaltenen virusneutralisierenden AK verhindert, ist eine spezifische Neutralisierung nachgewiesen (BÜTTNER, 2007). Für den SNT wird eine Serumverdünnungsreihe hergestellt und mit einer definierten Virusdosis inkubiert (POVEY & JOHNSON, 1969a, 1969b). Zunächst werden dazu Zellen in einer 96-Loch-Platte ausgesät und inkubiert. In der Zwischenzeit werden in einer separaten Mikrotiterplatte die zu untersuchenden Seren 1:10 vorverdünnt und anschließend eine Verdünnungsreihe erstellt. Danach wird die Virus-Gebrauchsverdünnung zugegeben und mit den Verdünnungsstufen vorinkubiert (PEDERSEN & HAWKINS, 1995). Das AG-AK-Gemisch wird auf die Zellplatte übertragen und inkubiert (POVEY, 1974). Am Ende wird mithilfe eines Mikroskops die höchstmögliche Verdünnungsstufe ermittelt, bei welcher es aufgrund der vollständigen Bindung der AK an das Virus zu keinem cpE kommt (DAWSON et al., 1998). Da der indirekte ELISA zur Detektion von AK eine höhere Sensitivität aufweist als der SNT, wird dieser in der Praxis kaum verwendet (DAWSON et al., 1998).

1.2.4.3. Hämagglutinationshemmungstest (HAH)

BARTHOLOMEW und GILLESPIE (1968) versuchten erfolglos eine Hämagglutination von FHV-1 mit Erythrozyten von Schweinen nachzuweisen. Später wurde entdeckt, dass FHV-1 nur nach Anzüchtung in feline Nierenzellkulturen oder einer diploiden feline Zungenzelllinie zu einer Hämagglutination von feline Erythrozyten führt (GILLESPIE et al., 1970). Mittels Hämagglutinationstests (HA) kann der Hämagglutinationstiter und damit die Virusaktivität bestimmt werden. Werden Hämagglutinine durch Zugabe von hämagglutinations-hemmenden AK gehemmt, können zugesetzte Erythrozyten nicht mehr an die Hämagglutinine agglutiniert werden (BÜTTNER, 2007). Diese Reaktion entspricht dem

Hämagglutinationshemmungstest (HAH). YAGAMI und Mitarbeiter (1985) beschrieben als Vorteil dieses Verfahrens, dass ein inaktiviertes Virus als Hämagglutinin-AG zum Nachweis von AK genutzt werden kann. Zudem zeichnet sich der HAH-Test durch seine schnelle, einfache und kostengünstige Durchführung aus, konnte sich aber nicht als Routinetest zum Nachweis von FHV-1-AK durchsetzen (GILLESPIE & SCOTT, 1973; YAGAMI et al., 1985). Der SNT wird aufgrund seiner höheren Sensitivität im Vergleich zum HAH in den meisten Studien zur Bestimmung von AK gegen FHV-1 eingesetzt (LAPPIN et al., 2002; MOUZIN et al., 2004; DIGANGI et al., 2011).

1.3. Direkte Nachweisverfahren

Mittels direkter Nachweisverfahren werden ganze Erreger oder Teile des Erregers nachgewiesen. Direkte Verfahren werden zum Nachweis einer akuten Infektion mit FHV-1 empfohlen (THIRY et al., 2009).

1.3.1. Prävalenz

Bei Katzen mit Katzenschnupfensymptomen wurden für FHV-1 Prävalenzen zwischen 7 und 91 % ermittelt (STILES et al., 1997a; BURNS et al., 2011). Für gesunde Katzen liegt die Prävalenz zwischen 0 und 31 % (POVEY & JOHNSON, 1971; BECH-NIELSEN et al., 1980; SHEWEN et al., 1980b; STILES et al., 1997a; NASISSE et al., 1998; BURGESSER et al., 1999; MAGGS et al., 1999). In einer in Deutschland durchgeführten Studie konnten GASTON und Mitarbeiter (2004) bei Katzen mit respiratorischen Symptomen eine Prävalenz von 18 % ermitteln. Eine weitere Studie aus Deutschland konnte bei Katzen mit akuter Katzenschnupfensymptomatik eine Prävalenz von 19 % detektieren (ADLER et al., 2007). Die Prävalenzdaten sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Prävalenz des feline Herpesvirus-1 in Katzenpopulationen mittels direktem Erregernachweis (VI = Virusisolierung, IFT = Immunfluoreszenztest, k. PCR = konventionelle Polymerase-Kettenreaktion, n. PCR = nested-Polymerase-Kettenreaktion)

| Nachweisverfahren | Prävalenz in % | Anzahl an Katzen | Population | Land | Autor |
|-------------------|----------------|------------------|--|------|-----------------------|
| IFT | 0 | 15 | Gesunde Katzen | USA | Stiles et al. (1997b) |
| | 6,6 | 15 | Katzen mit respiratorischen Symptomen und Konjunktivitis | | |
| | 0 | 16 | Katzen mit Konjunktivitis | | |
| | | | | | |

| | | | | | |
|------------------|--------------------------|---------------------|---|--------------------|-----------------------------|
| IFT | 10,7 7,5 | 84 211 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen | USA | Burgesser et al. (1999) |
| IFT | 28,3 50,0 26,3 | 17 38 46 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen Katzen mit chronischen Augenproblem-en | Großbritanni en | Maggs et al. (1999) |
| k. PCR | 16,0 8,0 | 116 99 | Katzen mit respiratorischen Symptomen Gesunde Katzen | Großbritanni en | Helps et al. (2005) |
| k. PCR | 13,3 50,0 86,6 | 15 16 15 | Gesunde Katzen Katzen mit Konjunktivitis Katzen mit respiratorischen Symptomen und Konjunktivitis | USA | Stiles et al. (1997b) |
| k. PCR | 18,3 | 296 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | Deutschland | Gaston et al. (2004) |
| k. PCR | 19,3 | 328 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | Deutschland | Adler et al. (2007) |
| k. PCR | 42,0 | 100 | Katzen mit respiratorischen Symptomen und/oder Konjunktivitis | Italien | Di Martino et al. (2007) |
| k. PCR n. PCR | 9,1 86,4 | 22 22 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | Japan | Hara et al. (1996) |
| k. PCR | 20,1 | 299 | Katzen mit und ohne respiratorische Symptome | Belgien | Zicola et al. (2009) |
| k. PCR | 5,9 76,3 55,1 | 17 156 59 | Gesunde Katzen Katzen mit Korneasequester Katzen mit eosinophiler Keratitis | USA | Nasisse et al. (1998) |
| n. PCR | 30,9 13,7 | 84 211 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen | USA | Burgesser et al. (1999) |
| | | | | | |

| | | | | | |
|---------------|---------------|----------------|---|----------------|----------------------------|
| real-time PCR | 91,0 | 22 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | USA | Burns et al. (2011) |
| VI | 7,7 33,8 | 65 65 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen | USA | Bech-Nielsen et al. (1980) |
| VI | 18,2 | 17 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | Großbritannien | Maggs et al. (1999) |
| VI | 4,2 | 6866 | Katzen mit und ohne respiratorischen Symptomen | Großbritannien | Harbour et al. (1991) |
| VI | 0 0 7,7 | 50 26 30 | Gesunde Katzen Katzen mit Konjunktivitis Katzen mit Rhinitis und Konjunktivitis | USA | Shewen et al. (1980b) |
| VI | 4,3 24,6 | 47 69 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen | Großbritannien | Povey et al. (1971) |
| VI | 10,7 8,5 | 84 211 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen | USA | Burgesser et al. (1999) |

1.3.2. Tests

Als direkte Nachweisverfahren können die Virusisolierung (VI), der direkte ELISA, der direkte IFT und die PCR eingesetzt werden. Latent infizierte Katzen sind unabhängig von der Untersuchungsmethode schwer zu identifizieren, da das Virus nur während der intermittierenden Ausscheidungsphasen nachweisbar ist (SYKES, 2001). Daher sollte der Test bei einem negativen Ergebnis wiederholt werden.

1.3.2.1. Virusisolierung (VI)

Die VI galt lange als Goldstandard zum direkten Nachweis des FHV-1, da sich das Virus schnell vermehrt und zu einem charakteristischem cpE führt (NASISSE & WEIGLER, 1997; MAGGS, 2005a). Bei einer primären FHV-1-Infektion kann das Virus von Konjunktiven, Nase, Rachen und Lunge mittels Tupferproben oder Biopsien *in vivo* oder *post mortem* isoliert werden (THIRY et al., 2009). Die Tupfer müssen in einem Virustransportmedium mit Antibiotikum innerhalb von 24 Stunden gekühlt in ein Labor versandt werden (SYKES et al.,

1997b; SYKES, 2001). Nach Anzüchtung in einer feline Nierenzellkultur (Crandell-Reeses feline kidney cells = CrFK) kann die Anwesenheit des FHV-1 anhand des zytopathischen Effektes und der Formation von intranukleären Einschlusskörperchen nachgewiesen werden (BISTNER et al., 1971; GASKELL et al., 2007). Die FHV-1-VI kann aber auch zu falsch-negativen Ergebnissen führen, wenn eine nicht ausreichende Anzahl an Viren im Probenmaterial vorhanden ist oder die Anwesenheit von AK in extrazellulärer Flüssigkeit die virale Replikation *in vitro* hemmt (MARSILIO et al., 2004). Auch während einer chronischen oder rezidivierenden Infektion kann ein Nachweis mittels VI aufgrund der transienten Virusausscheidung erschwert sein (VOGTLIN et al., 2002). Zudem vermehrt sich FCV in der Zellkultur schneller als FHV-1 und kann somit den cpE des FHV-1 verschleiern (SYKES, 2001, 2014a). Obwohl die VI eine hohe Sensitivität aufweist, eignet sie sich aufgrund der logistischen Schwierigkeit des Transportes und des zeitlichen Faktors der Virusanzüchtung nicht für den routinemäßigen Einsatz (MAGGS, 2005b). Es wurde empfohlen, die VI in Kombination mit dem IFT durchzuführen, um eine höhere Sensitivität zu erreichen (MAGGS et al., 1999).

1.3.2.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Es gibt zwar keinen Antigen-*capture*-ELISA für den Nachweis des FHV-1, jedoch einen kommerziellen ELISA für die Detektion des humanen Herpes-simplex-Virus-1 (HSV-1) (Herpcheq[®]: Dupont, Wilmington, DE), welcher in einer Studie eine Sensitivität von 90 % und eine Spezifität von 99 % für den Nachweis des FHV-1 aufwies (NASISSE & WEIGLER, 1997). Da die PCR-Methoden für den Nachweis des FHV-1 mittlerweile als Goldstandard gelten, kam es zu keiner Weiterentwicklung des direkten ELISA (RAMPAZZO et al., 2003).

1.3.2.3. Immunfluoreszenz von Direktausstrichen (IFT)

Der direkte Immunfluoreszenztest (IFT) zum Nachweis von AG in Zellausstrichen wurde vor Etablierung der PCR häufig zur FHV-1-Detektion angewendet (NASISSE et al., 1993; STILES et al., 1997b; MAGGS et al., 1999). Um eine maximale Zellzahl und gute Qualität zu erzielen, sollten konjunktivale Zellen mit Hilfe einer "cytobrush" und Hornhautzellen mit einem Kimuraspatel gewonnen werden (GOULD, 2011). Die Proben müssen vor Gabe von Fluoreszein-Augentropfen entnommen werden, da der Farbstoff zu einem falsch-positiven Fluoreszenzergebnis führen kann (DA SILVA-CURIEL et al., 1991). Die Tupfer werden auf einem Objektträger abgerollt und mit einem spezifischen, gegen das FHV-1 gerichteten AK beschichtet, welcher an einen Fluoreszein-Farbstoff (z. B. Fluoreszin oder Rhodaminderivate) gekoppelt ist (REINARD, 2010b). Der IFT ist ein subjektiver Test, da die Ergebnisse von der

individuellen Beurteilung der Objektträger abhängen (NASISSE & WEIGLER, 1997; ANDREW, 2001). Falsch-negative Ergebnisse können aufgrund einer geringen Anzahl von viralem AG oder durch das Vorhandensein körpereigener AK oder Entzündungszellmediatoren verursacht werden (BURGESSER et al., 1999). Das Testverfahren ist zudem weniger sensitiv als VI und PCR und kann zu falsch-positiven Ergebnissen führen, wenn sich unspezifisches Fluoreszein im Hintergrund ablagert (BURGESSER et al., 1999; SYKES, 2001, 2014a).

1.3.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels PCR ist ein schnelles, relativ kostensparendes und sehr sensitives Nachweisverfahren zur Detektion von FHV-1, welches von vielen veterinärmedizinischen Labors kommerziell angeboten wird (RUCH-GALLIE et al., 2011; SYKES, 2014a). Durch die Identifikation des Thymidinkinase- (TK-) Gens im FHV-1-Genom, welches auch für alle anderen alpha-Herpesviren charakteristisch ist, wurde es möglich, die ersten PCR-Tests für das Virus zu entwickeln (REUBEL et al., 1993; WEIGLER et al., 1997b). Es stehen drei verschiedene PCR-Methoden zum Nachweis von FHV-1 zur Verfügung: konventionelle PCR (RAMPAZZO et al., 2003), real-time PCR (VOGTLIN et al., 2002; HELPS et al., 2003; HUSSEIN & FIELD, 2008) und nested-PCR (STILES et al., 1997a). Die konventionelle PCR (k. PCR) erfolgt in drei Schritten: 1. Denaturierung, 2. Anlagerung (annealing) und 3. Elongation (extension) (SAIKI et al., 1988). Eine Analyse der PCR Produkte, der Amplikons, erfolgt meist mittels Gelelektrophorese (SELLON, 2003).

Bei der nested-PCR (n. PCR), wird verhindert, dass bei einer Amplifikation von einem bestimmten DNA-Bereich aus einem komplexen Genom unspezifische Amplifikate auftreten; somit wird die Sensitivität der PCR erhöht. Bei der n. PCR wird mit dem Produkt der ersten PCR eine zweite PCR durchgeführt (REINARD, 2010a). Das hierbei eingesetzte zweite Primerpaar bindet an Sequenzbereiche, die innerhalb des zuvor amplifizierten DNA-Bereiches binden (nested primer) und so ein kürzeres DNA-Fragment amplifizieren (HARA et al., 1996). Sie ist im Vergleich zur k. PCR aufgrund ihrer Spezifitätsüberprüfung der ersten PCR sensitiver (HARA et al., 1996; STILES et al., 1997b), gleichzeitig aber empfindlicher für eine Kontamination (STILES et al., 1997b).

Quantitative PCR-Methoden (qPCR), welche die Menge an gebildeter DNA am Ende jedes Zyklus messen, ermöglichen es, die Viruslast zu quantifizieren und gelten somit als sensitivstes Nachweisverfahren zur Detektion von FHV-1 (LOW et al., 2007). Aufgrund der

Möglichkeit einer Quantifizierung ist die real-time PCR die Standardmethode der meisten Labore (VOLOPICH et al., 2005). Die Quantifizierung der PCR-Produkte kann mit Fluoreszenzfarbstoffen, wie dem SYBR Green, erfolgen oder anhand des Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) (KUBISTA et al., 2006). VOGTLIN und Mitarbeitern (2002) gelang ein FHV-1-Nachweis mittels fluoreszierender real-time TaqMan-PCR bei Katzen mit Konjunktivitis. TOWNSEND und Mitarbeiter (2004) entwickelten eine reverse-transkriptase PCR (RT-PCR) zum Nachweis von FHV-1 latenz-assoziierten-Transkripten (LATs) im *Ganglion trigeminale* und in der Kornea bei latent infizierten Katzen ohne klinische Symptome. In einer Studie von HELPS und Mitarbeitern (2003) konnte FHV-1 mittels real-time PCR bei 58 Katzen mit Katzenschnupfen nachgewiesen werden, während mit Hilfe der VI nur 11 der 58 positiven Katzen detektiert werden konnten. Somit weist die PCR im Vergleich zur VI eine höhere Sensitivität auf.

Ein positiver PCR-Nachweis von FHV-1-DNA kann durch eine akute Infektion mit aktiver Replikation, eine persistierende chronische Infektion mit niedriger Replikationsrate, eine Reaktivierung bei einer latenten Infektion oder durch nicht-replikationsfähige DNA-Bruchstücke verursacht werden (STROOP & BARINGER, 1982; O'BRIEN & TAYLOR, 1989; REUBEL et al., 1993; TOWNSEND et al., 2004). Nur anhand eines positiven PCR-Ergebnisses kann somit nicht zwischen einer latenten Infektion und einer FHV-1-induzierten klinischen Erkrankung unterschieden werden (MAGGS et al., 1999; MAGGS & CLARKE, 2005). Da es bisher keine kommerzielle Markervakzine für das FHV-1 gibt, kann ein positives PCR-Ergebnis sowohl durch Impfstoff als auch Feldvirus hervorgerufen werden (SUSSMAN et al., 1997; WEIGLER et al., 1997a; MAGGS & CLARKE, 2005; RUCHGALLIE et al., 2011). Die PCR zeigt im Vergleich zu VI und IFT eine höhere Sensitivität und kann FHV-1 häufig auch bei chronischen oder rezidivierenden Infektionen mit geringer Virusausscheidung nachweisen (REUBEL et al., 1993; STILES et al., 1997b; BURGESSER et al., 1999). Somit hat sich die PCR zur Standardnachweismethode etabliert.

2. Klinik und Diagnostik der feline Calicivirusinfektion

FCV, ein kleines unbehülltes Ribonucleinsäure- (RNA-) Virus, verfügt wie andere RNA-Viren auch über ein Genom, welches einer kontinuierlichen Mutation unterliegt (SYKES et al., 1998). So kommt es zu einer steigenden Anzahl an unterschiedlichen FCV-Stämmen (SYKES, 2014a). Da sich die verschiedenen Stämme in Gewebetropismus und Virulenz stark unterscheiden, gibt es eine große Spannbreite an klinischen Symptomen, die mit einer FCV-Infektion einhergehen können (GASKELL et al., 2012).

2.1. Klinische Symptome

Einige Autoren postulieren, dass FCV-Infektionen in vielen Fällen mit milderen klinischen Symptomen und einer geringeren Störung des Allgemeinbefindens verlaufen als FHV-1-Infektionen (SYKES, 2001; GASKELL et al., 2012). Nach einer kurzen Inkubationszeit von zwei bis fünf Tagen können bei den meisten Katzen Apathie und Fieber festgestellt werden (RADFORD et al., 2004). Als pathognomonisches Symptom einer FCV-Infektion gelten großflächige Ulzerationen in der Maulhöhle, vor allem auf der Zunge, aber auch auf Lippen, Nase oder Haut (FLAGSTAD, 1973; GASKELL et al., 2011) (Abb. 2). Unspezifische Symptome sind Anorexie, Fieber, ein schlechtes Allgemeinbefinden und Apathie (RAMSEY, 2000). Es treten auch Symptome wie Niesen, Augen- und Nasenausfluss auf, welche aber weniger stark ausgeprägt sind als bei Infektionen mit FHV-1 (POVEY & JOHNSON, 1971; GILLESPIE & SCOTT, 1973; GASKELL et al., 2012). In experimentellen Studien konnte bei FCV-infizierten Katzen auch eine Konjunktivitis beobachtet werden (HOOVER & KAHN, 1975; LOVE, 1975; FORD, 1991, 1997) .

Die multifaktoriell bedingte lymphozytäre/plasmazytäre Gingivostomatitis (LPGS) gilt als weitere klinische Manifestation (LYON, 2005). Sie wird wahrscheinlich durch eine persistierende FCV-Infektion mit nachfolgenden immunmedierten Reaktionen verursacht (REUBEL et al., 1992; ADDIE et al., 2003). Nach Abheilung einer akuten FCV-Erkrankung gehen die Katzen bei der LPGS in ein Virusträgerstadium über, in dessen Folge sie die typischen „blumenkohlartigen“ proliferativen und ulzerösen Veränderungen im Rachenbereich und um die Zähne entwickeln können. In mehreren Studien konnten bei ca. 80 % der Katzen mit LPGS FCV nachgewiesen werden (KNOWLES et al., 1989; WATERS et al., 1993). Im Vergleich dazu schieden nur 20 % der gesunden Kontrollkatzen FCV aus (THOMPSON et al., 1984; KNOWLES et al., 1989). Bei experimentell infizierten Katzen konnte bisher nur eine akute Stomatitis und keine chronische Verlaufsform induziert werden (KNOWLES et al., 1991). Es ist bekannt, dass eine Koinfektion mit dem feline Immundefizienzvirus (FIV) Auftreten und Schweregrad der LPGS begünstigen kann (WATERS et al., 1993).

Bestimmte FCV-Stämme können zudem bei Katzenwelpen eine akute Arthritis verursachen, die zu transienten Lahmheitssymptomen führt und als “limping kitten syndrome” bezeichnet wird. In zwei mit FCV experimentell infizierten Gruppen traten bei Katzenwelpen zwischen sechs und zwölf Wochen Fieber, Apathie und eine stark ausgeprägte Lahmheit auf (PEDERSEN et al., 1983; DAWSON et al., 1994b). Die Lahmheit kann mit respiratorischen Symptomen assoziiert sein. Meist werden wechselnde Lahmheit und Fieber beobachtet

(SYKES, 2001). Auch nach einer Impfung gegen FCV konnten bei Katzen Lahmheiten mit oder ohne respiratorische Symptome beobachtet werden (DAWSON et al., 1993).

In den letzten Jahren wurden in mehreren europäischen Ländern und in den USA vorwiegend in Tierkliniken Ausbrüche mit virulenten systemischen Caliciviren (FCV- associated virulent systemic disease = FCV-VSD) beschrieben (SCHORR-EVANS et al., 2003; COYNE et al., 2006; REYNOLDS et al., 2009; BATTILANI et al., 2013). Auch in Deutschland wurden zwei Ausbrüche mit jeweils 55 und vier erkrankten Katzen dokumentiert; beide gingen mit einer hohen Mortalitätsrate einher (SCHULZ et al., 2011). Verantwortlich hierfür sind neue virulente Stämme des FCV, die *de novo* durch Mutationen in der Katze entstehen. Katzen, welche an einer FCV-VSD erkranken, können eine Vielzahl von Symptomen zeigen, zu denen hohes Fieber, Gesichtssedeme, ulzerative Dermatitis, Enteritis, Pneumonie, Blutungsneigung und Ikterus zählen (RADFORD et al., 2007; REYNOLDS et al., 2009). Die Ausbrüche verlaufen selbstlimitierend, gehen aber, besonders bei geimpften erwachsenen Katzen, mit einer hohen Letalität und Morbidität einher (HURLEY et al., 2004; HARTMANN, 2009; BATTILANI et al., 2013).

FCV kann zudem eine interstitielle Pneumonie verursachen, die durch pulmonäre Stauung, Lungenödem, Lungenemphysem und fokale Alveolitis charakterisiert ist (POVEY & JOHNSON, 1971; POVEY & HALE, 1974; ORMEROD et al., 1979). Weiterhin wird über einen möglichen Zusammenhang zwischen akuten FCV-Infektionen von tragenden Kätzinnen und Aborten berichtet, da das Virus bei einem Fetus mit petechialen Hautblutungen isoliert werden konnte (ELLIS, 1981; VAN VUUREN et al., 1999). In anderen Studien wurden mögliche Zusammenhänge zwischen FCV-Infektionen und Urolithiasis sowie Harnwegsinfektionen untersucht, wobei bisher keine eindeutige Assoziation festgestellt werden konnte (RICH & FABRICANT, 1971; RICE et al., 2002) .



Abb. 2: FCV-induzierte Zungenulzerationen (GASKELL et al., 2012)

2.2. Indirekte Nachweisverfahren

Ein Nachweis von AK gegen das FCV ist durch indirekte Testverfahren möglich. Neutralisierende AK können ca. ab dem siebten Tag nach einer FCV-Infektion nachgewiesen werden (KAHN et al., 1975).

2.2.1. Bedeutung von Antikörpern

AK gegen das FCV können aufgrund einer akuten oder chronischen Infektion, einer vorausgegangen Impfung oder bei Welpen mit maternalen AK nachgewiesen werden. Maternale AK können bei den meisten Welpen innerhalb der ersten zehn bis 14 Lebenswochen detektiert werden, wobei ein niedriger Titer nicht gegen eine subklinische Infektion schützt und die Katzenwelpen damit Trägartiere ohne klinischen Symptome werden können (JOHNSON & POVEY, 1983). Die Detektion von AK ist aufgrund der möglichen Interferenz mit dem Impftiter und der hohen Prävalenz von subklinisch infizierten Katzen nicht als zuverlässiger Test für den Nachweis einer klinisch manifesten FCV-Infektion anzusehen (SYKES, 2014a). Aufgrund der großen Vielfalt an FCV-Stämmen ist die Übereinstimmung zwischen dem im Test verwendeten und dem in der Probe zu untersuchenden Virus entscheidend, um AK nachweisen zu können. Die Sensitivität der verschiedenen Testverfahren zur Detektion von AK ist somit abhängig vom Grad der

Homologie zwischen Virus und FCV-Stamm, der im Test eingesetzt wird (SYKES, 2014a).

2.2.2. Prävalenz

In einer Studie von LAZAROVICZ und Mitarbeitern (1982) konnte eine FCV-Antikörperprävalenz von 100 % bei Katzen mit respiratorischen Symptomen ermittelt werden. Auch eine Studie bei Katzen aus Versuchskolonien zeigte eine hohe Prävalenz von 81 % (YAGAMI et al., 1985). LAPPIN und Mitarbeiter (2002) konnten bei Hauskatzen mit unbekannter Symptomatik eine AK-Prävalenz von 92 % detektieren. Die Prävalenzdaten sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Prävalenz von Antikörpern gegen das feline Calicivirus in Katzenpopulationen (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay, SNT = Serumneutralisationstest)

| Nachweisverfahren | Prävalenz in % | Anzahl an Katzen | Population | Land | Autor |
|-------------------|----------------|------------------|---|---------|--------------------------|
| ELISA | 92,4 | 267 | Hauskatzen, unselektiert | USA | Lappin et al. (2002) |
| SNT | 81,3 | 507 | Versuchskolonie, unselektiert | Japan | Yagami et al. (1985) |
| SNT | 93,5 100 | 92 108 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen | Schweiz | Lazarovicz et al. (1982) |

2.2.3. Vorhersage eines Schutzes

Die meisten Katzen entwickeln nach einer FCV-Infektion einen gewissen Grad an Immunität, die generell länger anhält als der Schutz nach einer FHV-1-Infektion (GASKELL et al., 2012). In einer Studie von SCOTT und GEISSINGER (1999) konnte gezeigt werden, dass nach Impfung ein hoher FCV-AK-Titer für mindestens vier Jahre vorhanden ist, beim FHV-1 dagegen nur drei Jahre nach Impfung noch AK messbar sind. POVEY und INGERSOLL (1975) postulierten einen Schutz vor einer Erkrankung ab einem FCV-AK-Titer von 1:16. KAHN und GILLESPIE (1971) stellten fest, dass Katzenwelpen mit einem Titer von maternalen AK zwischen 1:4 und 1:16 nach Aerosolexposition mit dem FCV klinische Symptome entwickelten. Insgesamt fiel die Mortalität bei Welpen mit einem nachweisbaren AK-Titer aber geringer aus als bei Welpen ohne messbare AK.

Trotz der großen Variabilität zwischen den verschiedenen Stämme des FCV existieren Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen feline Caliciviren (SYKES, 2014a). Dies beweist

eine Studie, in der bei Katzen mit messbarem AK-Titer nach erneuter experimenteller Infektion mit einem anderen pathogenen FCV-Stamm eine kürzere Ausscheidungsdauer des Virus und mildere klinische Symptome im Vergleich zur vorausgegangenen Erstinfektion dokumentiert wurden (POVEY & INGERSOLL, 1975). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass eine Infektion mit einem FCV-Stamm niedriger Virulenz eine Immunität induzieren kann, welche nach Reinfektion mit einem anderen FCV-Stamm vor klinischen Symptomen schützt (KAHN et al., 1975). In anderen Studien konnte trotz eines klinisch nachweisbaren Schutzes vor Erkrankung bei manchen Katzen nur ein niedriger AK-Titer gemessen werden; dies ist möglicherweise durch eine vorwiegend zellvermittelte lokale Immunität erklärbar (THAM & STUDDERT, 1987; PEDERSEN & HAWKINS, 1995). Aufgrund der Inkubationszeit von zwei bis zehn Tagen und der Dauer bis zur AK-Bildung von sechs bis 14 Tagen (PLANZ et al., 1996) können klinische Symptome bereits auftreten, bevor zirkulierende AK messbar sind (RADFORD et al., 2009).

Da das FCV typischerweise eine Vielzahl an antigenetischen und pathogenetischen Variationen aufweist, stellt die Entwicklung geeigneter Impfstoffe eine große Herausforderung dar (POULET et al., 2005). Alle erhältlichen FCV-Impfstoffe verhindern zwar in den meisten Fällen das Auftreten von schweren klinischen Symptomen, können aber nicht vor einer Infektion mit milden klinischen Symptomen oder einer subklinischen Infektion schützen (POVEY & INGERSOLL, 1975; PEDERSEN & HAWKINS, 1995; RADFORD et al., 2006). Zudem schützt die Impfung nicht gegen FCV-VSD-Stämme (PEDERSEN et al., 2000). Eine Mutation des Virus im Wirt im Verlauf einer persistierenden Infektion kann den Erfolg der Impfung weiter einschränken (CARLIER & TRUYENS, 1995). In einer Prävalenzstudie von BINNS und Mitarbeitern (2000) konnte in einer Katzenpopulation kein Unterschied hinsichtlich der Ausscheidung des Virus festgestellt werden, da bei 26 % der geimpften im Vergleich zu 30 % der ungeimpften Katzen eine Virusausscheidung messbar war. Es ist davon auszugehen, dass geimpfte Katzen, die vielen heterologen Stämmen in der Umwelt ausgesetzt sind, trotz Kreuzreaktionen durch die Impfstämme nur teilweise gegen die zirkulierenden Feldisolate geschützt sind (LAURITZEN et al., 1997; PEDERSEN et al., 2000). In einer Studie aus Japan lag die Kreuzreaktion zwischen AK, die gegen Impfstämme produziert wurden und FCV-Feldisolaten nur bei 22 - 70 % (HOHDATSU et al., 1999). Daher wurde versucht, einen besseren Schutz durch Kombination verschiedener Impfstämme (POULET et al., 2005), Ergänzung neuer Impfstämme, Einsatz von sekundären DNA-Generationen oder Vektorimpfstoffen zu erreichen (MCCABE et al., 2002; SCHWANTES et al., 2003).

2.2.4. Tests

Als indirekte Verfahren zum Nachweis von AK gegen das FCV dienen der SNT, die KBR, der IFT von Direktausstrichen und der indirekte ELISA (POVEY, 1974; THAM & STUDDERT, 1987). Allgemein können im Gegensatz zu einer FHV-1-Infektion bei einer FCV-Infektion höhere AK-Titer nachgewiesen werden (POVEY & INGERSOLL, 1975).

2.2.4.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Bestimmung eines FCV-AK-Titers zur Vorhersage eines Schutzes gegen klinische Erkrankung wird für Tierheime und Mehrkatzenhaushalte empfohlen, um das Risiko von Krankheitsausbrüchen einzuschätzen (SCOTT & GEISSINGER, 1999; LAPPIN et al., 2002). In einer Studie von DIGANGI und Mitarbeitern (2011) wurde ein semiquantitativer indirekter ELISA-Schnelltest bei Katzen in Tierheimen zum Nachweis von AK gegen FCV und FHV-1 getestet, der eine Diagnose direkt Vorort ermöglicht. Dieser Test erwies sich als einfach anwendbar, schnell und preiswert (DIGANGI et al., 2011). Für das FCV ergaben sich eine Sensitivität von 90 % und eine Spezifität von 91 %. (DIGANGI et al., 2011). In einer Studie von LAPPIN und Mitarbeitern (2002) wurde ein ELISA zum Nachweis von protektiven AK im Serum von Katzen nach FCV-Impfung angewandt. Die Studie ergab eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen von SNT und HAH im Vergleich zum ELISA (93 %).

2.2.4.2. Serumneutralisationstest (SNT)

Der SNT ist ein häufig verwendeter Test zum Nachweis von FCV-AK, wobei der ELISA als sensitiver gilt (LAU et al., 1992; LAPPIN et al., 2002). AK-Titer über 1:32 werden beim SNT als protektiv eingestuft (MOUZIN et al., 2004; DIGANGI et al., 2011). In der Studie von HURLEY und Mitarbeitern (2004) konnte bei Katzen mit VSD-FCV eine gute Sensitivität und Spezifität für den SNT gezeigt werden, da alle mittels VI AK-positiv oder -negativ getesteten Tiere mit dem AK-Nachweis im SNT übereinstimmten. Zur Routinediagnostik ist der SNT nicht geeignet, da seine Sensitivität aufgrund der antigenetischen Variabilität des Virus von der Übereinstimmung zwischen Virus und eingesetztem AG abhängig ist (SYKES, 2001). Um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden, ist es daher wichtig, homologe Virus-AK-Paare einzusetzen (RADFORD et al., 2009). Der Test findet vor allem in der serologischen Untersuchung der verschiedenen FCV-Stämme Anwendung. So können Aussagen über ihre Kreuzreaktivität untereinander getroffen werden (POVEY, 1974; POVEY & INGERSOLL, 1975; JOHNSON & POVEY, 1983; POULET et al., 2005; DIGANGI et al., 2012).

2.2.4.3. Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)

GILLESPIE (1971) gelang es erstmals, das FCV in einer Zellkultur mittels indirektem IFT nachzuweisen. Mit Hilfe des indirekten IFT können virale Proteine in fixierten Zellen durch fluoreszierenden Farbstoff immunologisch sichtbar gemacht werden (REINARD, 2010b). Dazu werden CrFK-Zellen in einer Mikrotiterplatte kultiviert, mit dem FCV infiziert und anschließend mit Azeton fixiert (POULET et al., 2005). Nach Waschen mit PBSS werden die Zellen mit spezifischen Erst-AK bedeckt und inkubiert. Durch weiteres Waschen werden überschüssige AK entfernt und ein fluoreszierender, in PBSS verdünnter, Zweit-AK (Anti-Maus-IgG) hinzugefügt (LAURITZEN et al., 1997). Die Zellen werden schließlich mit einem inversen Immunfluoreszenzmikroskop untersucht (AMTSBERG et al., 2011). Der IFT erweist sich als ein schnell und einfach durchführbarer Test (GILLESPIE et al., 1971). Im Gegensatz zum ELISA wird der IFT aber aufgrund seiner geringeren Sensitivität nur noch selten zum AK-Nachweis angewendet (LAU et al., 1992).

2.3. Direkte Nachweisverfahren

Direkte Nachweisverfahren dienen zur AG-Detektion des FCV. Mit dem FCV infizierte Katzen können das Virus kontinuierlich über einen langen Zeitraum, auch über die klinische Genesung hinaus, im Durchschnitt 60 Tage bis lebenslang, ausscheiden (WARDLEY, 1976; SYKES, 2001; RADFORD et al., 2009). Aufgrund dieser konstanten Ausscheidung erweist sich der Nachweis der Virus-RNA im Gegensatz zum FHV-1-Nachweis als einfacher; die zahlreichen Antigenvarianten des FCV können jedoch zu falsch-negativen Testergebnissen führen (SYKES et al., 1998).

2.3.1. Prävalenz

Die für das FCV ermittelte Prävalenz liegt bei Katzen mit respiratorischen Symptomen zwischen 15 und 47 % (HELPS et al., 2005; DI MARTINO et al., 2007; ZICOLA et al., 2009; HOLST et al., 2010). In Deutschland wurde in einer Studie von 2001 bis 2003 bei Katzen mit respiratorischen Symptomen in Mehrkatzenhaushalten eine Prävalenz von 58 % mittels PCR detektiert (GASTON et al., 2004). Bei gesunden Katzen wurden Prävalenzen von 5 bis 49 % nachgewiesen (POVEY & JOHNSON, 1971; COUTTS et al., 1994; GASTON et al., 2004; HELPS et al., 2005; HOLST et al., 2010). Die Prävalenzdaten sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Prävalenz des feline Calicivirus in Katzenpopulationen mittels direktem Erregernachweis (VI = Virusisolierung, k. PCR = konventionelle Polymerase-Kettenreaktion)

| Nachweisverfahren | Prävalenz in % | Anzahl an Katzen | Population | Land | Autor |
|-------------------|----------------|------------------|--|----------------|----------------------------|
| k. PCR | 47,0 | 100 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | Italien | Di Martino et al. (2007) |
| k. PCR | 29,0 47,0 | 116 99 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen | Großbritannien | Helps et al. (2005) |
| k. PCR | 33,1 | 299 | Katzen, unselektiert | Belgien | Zicola et al. (2009) |
| k. PCR | 57,6 | 296 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | Deutschland | Gaston et al. (2004) |
| k. PCR | 9,6 | 104 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | USA | Sykes et al. (2001) |
| k. PCR | 5,0 15,0 | 20 20 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen und Konjunktivitis | Schweden | Holst et al. (2010) |
| VI | 19,1 17,4 | 47 69 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen | Großbritannien | Povey et al. (1971) |
| VI | 22,4 33,2 | 204 244 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen | Großbritannien | Binns et al. (2000) |
| VI | 52,5 | 59 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | Großbritannien | Knowles et al. (1989) |
| VI | 25,3 | 513 | Gesunde Katzen | Großbritannien | Coutts et al. (1994) |
| VI | 7,7 20,0 | 65 65 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen | USA | Bech-Nielsen et al. (1980) |

2.3.2. Tests

Verschiedene Methoden eignen sich zum Nachweis von FCV-AG. Als direkte Verfahren zum Nachweis des FCV-AG dienen VI, direkter IFT und PCR (ABD-ELDAIM et al., 2009).

2.3.2.1. Virusisolierung (VI)

Der Nachweis von FCV in der Zellkultur (Virusisolierung) gilt nach wie vor als eine sehr zuverlässige und einfache Methode (RADFORD et al., 2009). FCV wurde erstmals in einer einzellschichtigen Kultur von feline Nierenzellen isoliert (FASTIER, 1957). Eine Reihe von diploiden Zelllinien wie Thymus- oder Zungenzellen sind außerdem geeignet, um verschiedene FCV-Stämme anzuzüchten (CRANDELL et al., 1973). Innerhalb von einem bis drei Tagen bewirkt das FCV einen cpE in Zellkulturen. Eine Unterscheidung zum FHV-1 ist daher einfach, da das FHV-1 nur langsam innerhalb von zwölf bis 15 Tagen zu einem cpE führt und zudem intranukleäre Einschlusskörperchen bildet (GILLESPIE & SCOTT, 1973). Die VI mittels Zellkultur ist im Vergleich zum IFT die sensitivere Methode zum Nachweis von FCV-AG (GILLESPIE & SCOTT, 1973). Die Nachteile der VI wie hohe Kosten, spezielle Transportmedien und Zeitaufwand führen jedoch zu einer limitierten Einsatzfähigkeit für die Routinediagnostik (SYKES et al., 1998; RUCH-GALLIE et al., 2011). Zudem können eine zu geringe Anzahl an Virionen in der Probe und AK in der extrazellulären Flüssigkeit, welche eine Virusvermehrung *in vitro* verhindern, zu falsch-negativen Ergebnissen führen (MARSILIO et al., 2005).

2.3.2.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Direkte ELISA-Verfahren werden zum Nachweis von verschiedenen FCV-Stämmen mit Hilfe von monoklonalen oder polyklonalen AK angewandt (TAJIMA et al., 1998a). Für das Verfahren des Sandwich-ELISA wird eine Mikrotiterplatte benötigt, die mit einem spezifischem AK gegen das zu bestimmende FCV ("capture AK") beschichtet ist (AMTSBERG et al., 2011). Durch Zugabe von z. B. Peroxidase-konjugierten Anti-Maus-IgG, welche in der Lage sind, einen hinzugefügten Farbstoff durch Spaltung zu aktivieren, kann die Enzymaktivität photometrisch erfasst werden (TAJIMA et al., 1998b). Die Sensitivität des ELISA ist von der Spezifität der verwendeten AK zum Nachweis eines möglichst breiten Spektrums an FCV-AG abhängig. In einer Studie reagierte der verwendete monoklonale AK 4D7 zusammen mit dem polyklonalen IgG auf alle untersuchten FCV-Feldisolate *in vitro*. Unter Verwendung des gleichen Sandwich-ELISA wurden aber 10 % der mittels VI positiv getesteten Katzen mit Verdacht auf FURTD verpasst. Dieses Ergebnis impliziert, dass die VI zum Nachweis von FCV sensibler erscheint (TAJIMA et al., 1998b).

2.3.2.3. Direkter Immunfluoreszenztest (IFT)

Der direkte IFT hat den Vorteil, dass das virale FCV-AG direkt in den infizierten Zellen detektiert wird (GILLESPIE & SCOTT, 1973). Es ist eine schnelle und kostengünstige

Methode. Aufgrund der geringen Sensitivität wird der direkte IFT aber nur selten verwendet (ABD-ELDAIM et al., 2009).

2.3.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das FCV-Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA mit positiver Polarität, die drei offene Leseraster (open reading frame = ORF) beinhaltet (GEISSLER et al., 1997). ORF-1 kodiert ein Nichtstrukturprotein (SOSNOVTSEV et al., 2002), ORF 2 das virale Kapsidprotein 1 (VP1) (CARTER et al., 1992) und ORF 3 ein zweites kleineres Strukturprotein (VP2) (SOSNOVTSEV et al., 2005). Mittels PCR können Segmente der hypervariablen Regionen des VP1 nachgewiesen werden, wobei es sich aufgrund der geringen Nucleotid-Homogenität im VP1 (77,1 % – 81,0 %) zwischen den verschiedenen FCV-Isolaten als schwierig erweist, alle natürlich vorkommenden FCV-Stämme zu detektieren (ABD-ELDAIM et al., 2005). In einer Studie von WILHELM und Mitarbeitern (2006) wurde eine real-time PCR entwickelt, welche das VP2 in allen untersuchten FCV-Isolaten nachweisen konnte und somit eine hohe Sensitivität aufwies. In einer anderen Studie konnte erstmals mittels einer RT-PCR ein Segment von 670-680 Basenpaaren, welches in den hypervariablen Regionen des VP1 codiert ist, von mehreren natürlich infizierten Katzen amplifiziert werden (SYKES et al., 1998). Nach der Amplifikation werden diese PCR-Produkte mittels Restriktionsenzymen (Endonukleasen) in ein Fragmentierungsmuster überführt und können durch Agarose-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe identifiziert und differenziert werden (REINARD, 2010a). Die Sensitivität der k. PCR kann jedoch durch die Anwesenheit von Ribonukleasen in den Schleimsekreten, welche die hydrolytische Spaltung der Virus-RNA bedingen, herabgesetzt werden (RATCLIFF et al., 2002). Ein weiterer Nachteil ist, dass keine quantitative Bestimmung durchgeführt werden kann (HELPS et al., 2002).

Mittels real-time PCR, welche eine quantitative Analyse ermöglicht, werden Fluoreszenzmessungen am Ende und während eines PCR-Zyklus durchgeführt (KUBISTA et al., 2006). Eine real-time RT-PCR zur Detektion des FCV wurde von HELPS und Mitarbeitern (2002) entwickelt. Dabei wurde der Cyaninfarbstoff SYBR green I zum Nachweis der RNA verwendet. Nachteil des SYBR green I ist, dass es an jede doppelsträngige DNA, wie unspezifische PCR-Produkte und Primerdimere bindet, welche während der PCR gebildet werden (HELPS et al., 2002). Zwei Studien ermittelten für die real-time RT-PCR eine vergleichbare Sensitivität zur VI (SYKES et al., 1998; SYKES et al., 2001). In einer weiteren Studie konnte auch für die Taq Man real-time RT-PCR eine hohe Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden. Zudem erwies sie sich als eine zeitsparende

Methode im Vergleich zur k. PCR (ABD-ELDAIM et al., 2005). Weiterhin wurde zum Nachweis des FCV im Rahmen der real-time PCR die FRET-Technik untersucht (HELPS & HARBOUR, 2003). Bei dieser Methodik lässt sich ein Fluoreszenzfarbstoff (Donatormolekül) mit kurzwelligem Licht anregen, der dann die aufgenommene Energie in Form von Licht auf einen zweiten Farbstoff (Akzeptormolekül) überträgt (KUBISTA et al., 2006). Das Reporter/Donatormolekül gibt Auskunft über die Produktzunahme während der PCR-Zyklen (REINARD, 2010a). Liegt die Fluoreszenzzunahme der entsprechenden Probe über dem Schwellenwert, kann die Probe als positiv gewertet werden. Dieses einfache und schnelle Verfahren eignet sich für die Typisierung von verschiedenen FCV-Isolaten, da es bis zu fünf Polymorphismen in der variablen Region des FCV-Genoms nachweisen kann (HELPS & HARBOUR, 2003). Die real-time PCR stellt somit eine sehr sensitive und spezifische Methode zum Nachweis des FCV dar.

Anhand eines positiven PCR-Ergebnisses kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die amplifizierte RNA von einem lebensfähigen oder toten Virus stammt (RUCH-GALLIE et al., 2011). Es wird aber mittlerweile davon ausgegangen, dass totes Virusmaterial sehr schnell von spezifischen und unspezifischen Mechanismen des Immunsystems beseitigt wird und daher ein positives Ergebnis wahrscheinlich in Zusammenhang mit einer Infektion des Tieres gebracht werden kann (RUCH-GALLIE et al., 2011). Trotzdem sollte ein positives PCR-Ergebnis immer zusammen mit den klinischen Symptomen interpretiert werden (SELLON, 2003; RADFORD et al., 2009).

3. Klinik und Diagnostik der *Chlamydia-felis*-Infektion

C. felis ist ein kleines, obligat intrazelluläres (BECKER, 1978; OHYA et al., 2008), hochspezialisiertes, unbewegliches, kokkenartiges Bakterium mit einer lipidhaltigen Zellwand, welche der Wand von gramnegativen Bakterien ähnelt (RAMSEY, 2000). *C. felis* durchläuft während seiner Entwicklung eine intrazelluläre und eine extrazelluläre Phase mit Bildung von Elementarkörpern (EK), der infektiösen, extrazellulären, überlebensfähigen Form und den nicht infektiösen Retikularkörpern (RK), welche aus den EK im membrangebundenen Phagosom entstehen (SYKES, 2014b).

3.1. Klinische Symptome

C. felis wurde erstmals 1942 in den USA aus dem Lungengewebe einer an Pneumonie erkrankten Katze isoliert (BAKER). BAKER (1942) vermutete, dass es sich bei dem Erreger um ein Virus handelte. Das durch *C. felis* verursachte Krankheitsbild wurde ursprünglich als

„feline Pneumonitis“ bezeichnet (HOOVER et al., 1978). In einer weiteren Untersuchung von BAKER (1944) wurde gezeigt, dass eine durch *C. felis* hervorgerufene respiratorische Erkrankung durch Niesen und Husten in Kombination mit mukopurulentem Nasen- und Augenausfluss charakterisiert ist. Später wurde ein Zusammenhang zwischen *C.-felis*-Infektionen und Konjunktivitis-symptomen bei der Katze festgestellt (CELLO, 1971b). Darauf basierend konnte die Annahme, *C. felis* sei ein pulmonäres Pathogen, widerlegt werden; und Konjunktivitiden gelten seither als Leitsymptom einer *C.-felis*-Infektion (SHEWEN et al., 1978; PEDERSEN, 1988). Akut erkrankte Tiere zeigen zudem oft eine milde Rhinitis, Pharyngitis, Fieber, Apathie und Schwellung der mandibulären Lymphknoten (HELPS et al., 2001; GRUFFYDD-JONES et al., 2009). Die Inkubationszeit beträgt zwei bis fünf Tage (SYKES, 2014b).

Als charakteristisch für eine *C.-felis*-Infektion gilt eine akute, chronische oder rezidivierende Konjunktivitis, teilweise mit zusätzlichen respiratorischen Symptomen (SYKES & GREENE, 2012). Die Ursache für chronisch bestehende *C.-felis*-Infektionen ist bisher unbekannt. Vermutlich sind wiederholte Reinfektionen oder persistierende Infektionen der Grund für die Chronizität (SYKES, 2014b). In verschiedenen experimentellen Studien entwickelten Katzen nach einer *C.-felis*-Infektion Augenausfluss, Fieber und Konjunktivitis (MITZEL & STRATING, 1977; HOOVER et al., 1978; TERWEE et al., 1998). Zu Beginn kann die Konjunktivitis einseitig auftreten (HOOVER et al., 1978; GORDANA et al., 2010), in der Regel sind aber, im Gegensatz zur FHV-1-Konjunktivitis, nach ein paar Tagen beide Augen betroffen (SIBITZ et al., 2011). Typische Symptome der Konjunktivitis sind Hyperämie, Blepharospasmus und seröser Augenausfluss, wodurch die Konjunktiva zunehmend anschwillt und sich kleine Follikel bilden (CELLO, 1971a; SJODAHL-ESSEN et al., 2008). Der Augenausfluss ist zu Beginn meist serös und kann dann mukös bis eitrig werden und mehrere Monate persistieren (RAMSEY, 2000; MASUBUCHI et al., 2002). Sowohl Chemosis der Konjunktiva während der akuten Phase der Konjunktivitis als auch lymphoide Follikel während der chronischen Phase zählen zu den klassischen Symptomen (RAMSEY, 2000) (Abb. 3). Keratitis und Ulzerationen der Kornea treten im Zusammenhang mit einer *C.-felis*-Infektion im Allgemeinen nicht auf, wodurch eine Unterscheidung zur FHV-1-Infektion möglich ist (SHEWEN et al., 1978; NASISSE et al., 1993). *C. felis* gilt zudem als Ursache für eine neonatale Konjunktivitis bei neugeborenen Welpen (PEDERSEN, 1988). Anzeichen einer neonatalen Konjunktivitis sind das nicht vorhandene Öffnen der Augen zwischen dem siebten und zehnten Tag, sich vorwölbende geschlossene Augenlider und ein gelbliches Exsudat entlang des Lidrandes (RAMSEY, 2000). Werden die Augen geöffnet, kommt

muköses Exsudat und eine darunter liegende Konjunktivitis zum Vorschein (PEDERSEN, 1988).



Abb. 3: Chemosis und Konjunktivitis, verursacht durch *Chlamydia felis* (SYKES & GREENE, 2012)

Verschiedene Autoren beschreiben, dass bei Katzen nach experimenteller Infektion mit *C. felis* systemische Symptome wie Fieber, Apathie und Gewichtsverlust innerhalb der ersten zwei Wochen nach Exposition auftreten können (HOOVER et al., 1978; WILLS et al., 1987; TERWEE et al., 1998). Bei natürlich infizierten Katzen wird diese systemische Phase der Erkrankung jedoch seltener beobachtet (PEDERSEN, 1988). In einer Studie konnten bei sechs von sieben *C.-felis*-infizierten Katzen Rhinitissymptome dokumentiert werden (MOCHIZUKI et al., 2000). Respiratorische Symptome werden meist bei jungen Katzen im Alter von fünf Wochen bis neun Monaten beobachtet (WILLS et al., 1984). In einer Fallserie konnten *Chlamydia* spezie (spp.) aus den Lungen von drei Katzenwelpen isoliert werden, welche in den ersten Lebenstagen starben. Die Lungen erschienen in der pathologischen Untersuchung stark konsolidiert (SHEWEN et al., 1978).

Es wird vermutet, dass *C. felis* auch zu Aborten, neonataler Mortalität und Infertilität bei Katzen führen kann (SHEWEN et al., 1978; WILLS et al., 1984; WILLS, 1986; POINTON, 1994). Nach experimenteller konjunktivaler Infektion von Katzen mit *C. felis* konnten SYKES und Mitarbeiter (1999b) bei einer Katze nach der Geburt eine vaginale Ausscheidung

des Pathogens beobachten. In einer weiteren Studie konnte nach experimenteller Infektion ebenfalls eine langanhaltende Ausscheidung von *C. felis* über den Genitaltrakt festgestellt werden (WILLS et al., 1987).

Selten kann es im Verlauf einer *C.-felis*-Infektion zur Bakteriämie mit nachfolgenden systemischen Symptomen kommen, wie der Nachweis von *C. felis* aus verschiedenen Organen von Katzen nach experimenteller Infektion beweist (MASUBUCHI et al., 2002). *Chlamydia* spp. konnte in einer Studie von HARGIS und Mitarbeitern (1983) aus der Mukosa des Magens bei zwölf Katzen aus Katzenzuchten isoliert werden, die jedoch keine klinischen Symptome von Katzenschnupfen zeigten. Unter den zwölf Katzen waren sowohl klinisch gesunde Katzen als auch Katzen mit Gewichtsverlust unbekannter Ursache (HARGIS et al., 1983). Auch der Nachweis des Erregers aus rektalen Tupferproben spricht für ein subklinisches Reservoir des Pathogens im Magen-Darmtrakt (GRUFFYDD-JONES et al., 2009). In einer experimentellen Studie wurden zehn Katzenwelpen mit Chlamydien, die aus der Magenmukosa von Katzen isolierten wurden, über die Atemwege oder oral infiziert. Daraufhin entwickelten alle zehn Katzen bilateralen Augenausfluss und Konjunktivitis, drei Katzen Rhinitis und bei sechs konnten histologisch Anzeichen einer milden Gastritis festgestellt werden. Außerdem konnte *C. felis* in den epithelialen Zellen der Konjunktiva und der Nase bei allen Katzen nachgewiesen werden (GAILLARD et al., 1984). In einem weiteren Fall konnte *Chlamydia* spp. bei einer Katze mit Peritonitis unbekannter Ursache im Aszites detektiert werden (DICKIE & SNIFF, 1980).

Das klinische Bild kann darüber hinaus durch Mischinfektionen mit anderen Erregern des Katzenschnupfenkomplexes beeinflusst werden. Außerdem zeigten *C.-felis*-positive Katzen bei Koinfektion mit FIV stärkere klinische Symptome und eine längere Ausscheidungsphase als bei Monoinfektionen (O'DAIR et al., 1994).

3.2. Indirekte Nachweisverfahren

Mit indirekten Nachweisverfahren werden AK gegen *C. felis* nachgewiesen. Die Tests beruhen überwiegend auf dem Nachweis von IgG gegen das genusspezifische Lipopolysaccharid Antigen (LPS-AG) (TERWEE et al., 1998).

3.2.1. Bedeutung von Antikörpern

Der AK-Nachweis durch indirekte Verfahren ist zum alleinigen Nachweis einer *C.-felis*-Infektion nicht geeignet; er bestätigt nur den zuvor erfolgten Erregerkontakt (MCDONALD et al., 1998). Eine akute Infektion kann mittels AK-Nachweis nicht sicher nachgewiesen werden,

da der IgG-AK-Anstieg variabel ist und nicht immer mit der klinischen Symptomatik übereinstimmt (GORDANA et al., 2010). In einer Studie von TERWEE und Mitarbeitern (1998) konnte gezeigt werden, dass bei allen experimentell infizierten Katzen mit Konjunktivitis ein IgG-AK-Titer erst ab Tag 26 nach Infektion messbar war. Ebenso ist der IgM-AK-Titer nicht konstant bei allen mit *C. felis* infizierten Katzen erhöht (SYKES & GREENE, 2012). AK-Titer unter 1:32 gelten als negativ; Titer über 1:51 können für eine akute oder erst kürzlich vorausgegangene Infektion mit *C. felis* sprechen (GRUFFYDD-JONES et al., 2009). Nur anhand eines AK-Titers kann daher keine Aussage getroffen werden, ob es sich um eine akute oder chronische Infektion mit klinischen Symptomen oder eine subklinische Infektion handelt (HOLST et al., 2006). Allgemein kann aber anhand eines sehr hohen AK-Titers auf eine *C.-felis*-Infektion mit klinischer Manifestation geschlossen werden (WILLS et al., 1988). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bei Katzen mit chronischen Augensymptomen ein hoher AK-Titer dafür spricht, dass *C. felis* das primär verursachende Pathogen ist, während bei einem niedriger Titer eher von einer sekundären Beteiligung von *C. felis* ausgegangen wird (GRUFFYDD-JONES et al., 2009). Dabei muss immer beachtet werden, dass vorausgegangene Impfungen die Interpretation eines positiven Ergebnisses erschweren können (SYKES & GREENE, 2012). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich der AK-Nachweis nicht zur alleinigen Diagnosestellung einer *C.-felis*-Infektion eignet (MCDONALD et al., 1998).

3.2.2. Prävalenz

Die Prävalenz von AK gegen *C. felis* variiert stark. Bei Katzen mit Konjunktivitis und respiratorischen Symptomen ergaben sich Prävalenzen von 17 bis 77 % (STUDDERT et al., 1981; WILLS et al., 1986; WILLS et al., 1988; NASISSE et al., 1993; GRUFFYDD-JONES et al., 1995; TRAVNICEK et al., 2002; GERHARDT et al., 2006), dagegen konnten bei gesunden Katzen lediglich Prävalenzen von 6 und 11 % ermittelt werden (GRUFFYDD-JONES et al., 1995; HOLST et al., 2006). In zwei Studien aus Deutschland wurden Prävalenzen von 19 % bei Katzen unbekannter Symptomatik (WERTH et al., 1987) und von 32 % bei Katzen mit Katzenschnupfen festgestellt (LAZAROWICZ, 1977). Die Prävalenzdaten sind in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Prävalenz von Antikörpern gegen *Chlamydia felis* in Katzenpopulationen (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay, KBR = Komplementbindungsreaktion, IFT = Immunfluoreszenztest)

| Nachweisverfahren | Prävalenz in % | Anzahl an Katzen | Population | Land | Autor |
|-------------------|----------------------|------------------|--|----------------|----------------------------|
| ELISA | 27,0 | 22 | Wildkatzen, unselektiert | Slowenien | Millan et al. (2009) |
| ELISA | 19,0 | 108 | Hauskatzen, unselektiert | Deutschland | Werth et al. (1987) |
| ELISA | 26,0 | 101 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | Großbritannien | Wills et al. (1986) |
| ELISA | 6,0 18,0 | 116 217 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen und Konjunktivitis | Neuseeland | Gruffydd et al. (1995) |
| ELISA | 77,0 | 13 | Katzen mit respiratorischen Symptomen und Konjunktivitis | Slovakei | Travnicek et al. (2002) |
| IFT | 18,0 | 61 | Katzen mit Konjunktivitis | USA | Nasisse et al. (1993) |
| IFT | 11,0 | 214 | Gesunde Katzen | Schweden | Holst et al. (2006) |
| IFT | 16,7 | 30 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | Slowenien | Dovc et al. (2008) |
| IFT | 60,0 | 25 | Katzen mit respiratorischen Symptomen und Konjunktivitis | Deutschland | Gerhardt et al. (2006) |
| IFT | 7,5 59,5 69,4 | 40 116 36 | Gesunde Katzen Katzen mit Konjunktivitis Katzen mit und ohne Konjunktivitis | Großbritannien | Wills et al. (1988) |
| IFT | 45,1 | 51 | Bauernhofkatzen, unselektiert | Großbritannien | Gethings et al. (1987) |
| IFT | 21,3 64,0 21,0 | 254 90 86 | Hauskatzen, unselektiert Tierheimkatzen, unselektiert Wildkatzen, unselektiert | Italien | Di Francesco et al. (2004) |
| KBR | 4,6 32,3 | 108 92 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen | Schweiz | Lazarovicz et al. (1982) |
| | | | | | |

| | | | | | |
|-----|--------------|-----------|---|------------|------------------------|
| KBR | 30,8 | 26 | Katzen mit Konjunktivitis | Australien | Shewen et al. (1980b) |
| KBR | 12,7 62,0 | 134 13 | Hauskatzen, unselektiert Katzen mit Konjunktivitis | Australien | Studdert et al. (1981) |

3.2.3. Vorhersage eines Schutzes

Nach einer Infektion mit *C. felis* entwickeln alle Katzen messbare AK. Eine Immunität scheint aber nur kurz anzudauern, da eine Erkrankung rezidivierend auftreten kann (CELLO, 1971b). Es ist fraglich, ob anhand zirkulierender AK eine Aussage über den Schutz vor der Erkrankung getroffen werden kann. Wahrscheinlicher ist, dass die zellvermittelte Immunantwort eine wichtige Rolle beim Schutz vor einer Infektion spielt (LONGBOTTOM & LIVINGSTONE, 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl große äußere Membranproteine (MOMPs) als auch polymorphe äußere Membranproteine (POMPs) entscheidend für die schützende Immunantwort sein können (TERWEE et al., 1998; LONGBOTTOM & LIVINGSTONE, 2006; HARLEY et al., 2010).

In Studien, in denen Katzen mit Lebendimpfstoffen vakziniert wurden, konnte festgestellt werden, dass durch eine Impfung in der Regel nur ein unvollständiger klinischer Schutz ausgebildet wird (SHEWEN et al., 1980a; WILLS et al., 1987). Nach experimenteller Infektion von geimpften und ungeimpften Katzen konnte bei allen Katzen eine Konjunktivitis beobachtet werden. Die klinischen Symptome bei den ungeimpften Katzen waren jedoch deutlich stärker ausgeprägt (WILLS et al., 1987). Allgemein versprechen modifizierte Lebendvakzine den besten Schutz (SHEWEN et al., 1980a), verhindern aber nicht die Vermehrung in den Schleimhäuten und die Ausscheidung des Erregers (WILLS et al., 1987; SYKES & GREENE, 2012).

In einer Studie von MCDONALD und Mitarbeitern (1998) korrelierten die AK-Titer mit der *C. felis*-Ausscheidung. Bei AK-negativen Katzen konnte *C. felis* auch mit Hilfe der PCR nicht detektiert werden. Dagegen konnte in einer Studie von HOLST und Mitarbeitern (2006) kein Unterschied in der AK-Prävalenz für *C. felis* bei Katzen mit einer früher überstandenen Konjunktivitis und Katzen ohne bekannte klinische Symptome festgestellt werden. Da bei alten Katzen meist nur eine geringe AK-Prävalenz für *C. felis* nachweisbar ist, ist davon auszugehen, dass eine altersabhängige Resistenz gegenüber einer *C. felis*-Infektion besteht (SYKES, 2014b). In einer Studie von WILLS und Mitarbeiter (1988) war die Prävalenz von FURTD bei Katzen in der Altersgruppe von fünf Wochen bis neun Monaten höher als bei

älteren Katzen.

Anhand eines AK-Titers kann wahrscheinlich keine Aussage über einen Schutz vor Erkrankung getroffen werden, da bei subklinisch infizierten Trägartieren trotz messbaren AK eine Reaktivierung oder Reinfektion möglich ist (CELLO, 1971b; HOLST et al., 2006). In der Humanmedizin konnte gezeigt werden, dass messbare IgG-AK gegen *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) mehrere Jahre bei subklinisch infizierten Patienten persistieren können (GIJSEN et al., 2002). In einer Studie von OHYA und Mitarbeitern (2008) konnte ein Anstieg des AK-Titers nur bei natürlich infizierten und nicht bei geimpften Tieren verzeichnet werden. Daher kann der Anstieg eines AK-Titers im Verlauf einer Erkrankung genutzt werden, um natürlich infizierte Tiere zu identifizieren (OHYA et al., 2008).

3.2.4. Tests

Verschiedene Testverfahren können zum Nachweis von AK gegen *C. felis* eingesetzt werden. Aufgrund der hohen Seroprävalenz weist ein positiver AK-Titer immer nur auf eine Exposition der Katze mit dem Erreger hin (RAMSEY, 2000).

3.2.4.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

SCHMEER und Mitarbeiter (1983) entwickelten erstmals einen ELISA zum Nachweis von humanen IgG- und IgM-AK gegen das genusspezifische Natriumdesoxycholat-lösliche *Chlamydia*-spp.-AG. Zum Nachweis feliner AK wird ein gegen Katzen-IgG gerichtetes Antiserum eingesetzt, das enzymatisch an eine alkalische Phosphatase oder Peroxidase konjugiert wird (DONATI et al., 2009; OHYA et al., 2010). In einer Studie von DONATI und Mitarbeitern (2009) wurden mittels ELISA und Western blot AK gegen das Plasmid-Protein pgp3 von *C. felis* nachgewiesen. Damit konnten bei 98 % der Katzen mit Konjunktivitis AK mittels ELISA gemessen werden. Alle positiven AK-Ergebnisse wurden mittels Mikroimmunfluoreszenz-Test bestätigt. Das Protein pgp3 wird in der Humanmedizin als Marker zum Nachweis einer akuten *C.-trachomatis*-Infektion verwendet (COMANDUCCI et al., 1994) und könnte sich ebenso als serologischer Test mit hoher Sensitivität und Spezifität für den Nachweis einer *C.-felis*-Infektion eignen (DONATI et al., 2009). In einer Studie von OHYA und Mitarbeitern (2010) wurde ein ELISA zur Unterscheidung zwischen geimpften und natürlich infizierten Katzen entwickelt. Dafür wurde das spezifische CF0218-Ag zur Detektion von *C.-felis*-AK eingesetzt. Anhand des ELISA konnten nur nach experimenteller Infektion mit *C. felis* und nicht nach vorausgegangener Impfung AK gegen das CF0218-AG detektiert werden. Diese Methode erwies sich somit als nützlicher serologischer Test und stimmte hinsichtlich der Sensitivität mit dem indirekten IFT überein (OHYA et al., 2010). Im

Vergleich zu Immunperoxidase-Technik, KBR und Agargelpräzipitationstest zeigt der ELISA bei gleicher Spezifität eine deutlich höhere Sensitivität (WERTH et al., 1987). Ein weiterer Vorteil des ELISA gegenüber der KBR ist die Möglichkeit, bei Anwendung spezifischer Konjugate ohne Vorbehandlung des Serums zwischen verschiedenen Antikörperklassen differenzieren zu können (SCHMEER et al., 1983).

3.2.4.2. Western blot (Immunoblot)

Beim Western Blot werden Proteine in einem Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen, um dort mit Hilfe von AK die spezifischen Proteine detektieren zu können (REINARD, 2010c). Vor dem eigentlichen Western blot wird das zu untersuchende Proteingemisch durch eine Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese in Proteinbanden aufgetrennt. Danach werden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran transferiert („blotting“) und angefärbt (SYKES et al., 1999b). Die Erregerproteine können durch spezifische monoklonale AK lokalisiert und nach ihrer Größe geordnet werden (BÜTTNER, 2007). Nach zwei Waschvorgängen werden zur Detektion der gebundenen Erregerproteine spezifische Sekundär-AK, welche enzymatisch an eine alkalische Phosphatase gebunden sind, eingesetzt (TERWEE et al., 1998). In einer Studie von TERWEE und Mitarbeitern (1998) konnte mit Hilfe des Western blots gezeigt werden, dass die Immunantwort nach einer *C. felis*-Infektion zur Bildung spezifischer IgG- und IgM-AK führt. Mit Hilfe des Western blots ist eine Differenzierung zwischen IgG- und IgM-AK möglich (TERWEE et al., 1998).

3.2.4.3. Komplementbindungsreaktion (KBR)

Die KBR wurde in verschiedenen Studien zum Nachweis von AK gegen *C. felis* angewandt (MCKERCHER, 1952; STUDDERT & MARTIN, 1970; CELLO, 1971b; POVEY & JOHNSON, 1971; MITZEL & STRATING, 1977; LAZAROWICZ et al., 1982; FUKUSHI et al., 1985). Für eine KBR werden Mikrotiterplatten verwendet, in deren Vertiefungen Serum in einer Verdünnungsreihe mit AG, Komplement und Erythrozyten inkubiert wird (CELLO, 1971b). Die KBR läuft in zwei Schritten ab: in der Hauptreaktion wird die Serumprobe durch Erhitzen dekomplementiert und in mehreren Verdünnungsstufen mit dem spezifischen *C. felis*-AG und einem definierten Kontroll-AG gemischt (SHEWEN et al., 1980a). Dann wird das Indikatorsystem im zweiten Schritt hinzugegeben, das aus Schafererythrozyten („Hammelerythrozyten“) und dagegen gerichteten komplementbindenden AK besteht (AMTSBERG et al., 2011). Ein positives Ergebnis besteht, wenn es zu keiner Lyse der Erythrozyten kommt, da beide Partner bereits während der ersten Reaktion verbraucht worden sind (KRÜGER & SEIDLER, 2007). In einer Studie erwies sich die KBR im Vergleich zum

indirekten IFT als unzuverlässig, da bei der Messung des AK-Titers mittels IFT wesentlich höhere Werte detektiert werden konnten (WILLS et al., 1987). Da der Nachweis technisch anspruchsvoll ist, wurde er mittlerweile durch neuere Verfahren, wie dem ELISA, ersetzt (SCHMEER et al., 1983).

3.2.4.4. Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)

Der indirekte IFT gilt als ein zuverlässiger Test zum Nachweis von *C.-felis*-AK. Mittels eines isolierten *C.-felis*-AG, welches an einen mit Fluoreszin gekoppelten IgG-AK gebunden ist, kann die Anwesenheit von AK nachgewiesen werden (DI FRANCESCO et al., 2004; OHYA et al., 2010). Die Durchführung und Modifizierung des IFT für die Veterinärmedizin erfolgte erstmals durch WILLS und Mitarbeiter (1988). Das Ergebnis eines IFT kann mit Hilfe eines standardisierten Fluoreszenzmikroskops visualisiert werden: AK-Titer über 1:32 gelten als positiv (Holst et al., 2006). Ein Nachteil des IFT ist, dass die Anwendung von topischen Fluoreszein-haltigen Augentropfen vor der Tupferprobenentnahme zu falsch-positiven Ergebnissen des indirekten IFT führen kann (DA SILVA-CURIEL et al., 1991).

3.3. Direkte Nachweisverfahren

Mit Hilfe direkter Nachweisverfahren werden Erreger, deren Antigene oder DNA nachgewiesen. Die Voraussetzung für das Gelingen aller direkter Verfahren ist eine ausreichende Anzahl an *C.-felis*-infizierten epithelialen Zellen in den zu untersuchenden Proben (SYKES, 2014b).

3.3.1. Prävalenz

C. felis wurde bei 14 bis 59 % der Katzen mit Konjunktivitis und respiratorischen Symptomen isoliert (MCDONALD et al., 1998; SYKES et al., 1999a; SYKES et al., 2001; CAI et al., 2002; HOLST et al., 2010), während 0 bis 15 % der gesunden Katzen als Träger identifiziert wurden (SHEWEN et al., 1980b; HOLST et al., 2010). Die in Deutschland in Mehrkatzenhaushalten ermittelte Prävalenz bei Katzen mit respiratorischen Symptomen lag bei 8 % und bei gesunden Katzen bei 3 % (GASTON et al., 2004). Die Prävalenzdaten sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Prävalenz von *Chlamydia felis* in Katzenpopulationen mittels direktem Erregernachweis (k. PCR = konventionelle Polymerase-Kettenreaktion, ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay, IFT = Immunfluoreszenztest)

| Nachweisverfahren | Prävalenz in % | Anzahl an Katzen | Population | Land | Autor |
|-------------------|----------------|------------------|---|----------------|-------------------------|
| ELISA | 18,4 | 217 | Katzen mit Konjunktivitis | Neuseeland | Gruffyd et al. (1995) |
| ELISA | 25,7 | 101 | Katzen mit Konjunktivitis | Großbritannien | Wills et al. (1986) |
| IFT | 18,0 | 61 | Katzen mit Konjunktivitis | USA | Nasisse et al. (1993) |
| IFT | 100,0 | 93 | Katzen mit Konjunktivitis | Slovakei | Halanova et. al. (2011) |
| duplex PCR | 22,5 | 36 | Katzen mit respiratorischen Symptomen und Konjunktivitis | Italien | Marsilio et al. (2004) |
| k. PCR | 26,9 | 26 | Katzen mit respiratorischen Symptomen und Konjunktivitis | Japan | Mochizuki et al. (2000) |
| k. PCR | 0 7,3 | 37 55 | Gesunde Katzen Katzen mit Konjunktivitis | USA | Low et al. (2007) |
| k. PCR | 1,1 14,3 | 95 462 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen | USA | Sykes et al. (1999a) |
| k. PCR | 20,0 | 312 | Katzen mit Konjunktivitis und/oder respiratorischen Symptomen | Großbritannien | McDonald et al. (1998) |
| k. PCR | 59,1 | 66 | Katzen mit respiratorischen Symptomen und Konjunktivitis | Japan | Cai et al. (2002) |
| real-time PCR | 15,0 15,0 | 20 20 | Gesunde Katzen Katzen mit respiratorischen Symptomen und/oder Konjunktivitis | Schweden | Holst et al. (2010) |
| real-time PCR | 11,5 | 104 | Katzen mit respiratorischen Symptomen | USA | Sykes et al. (2001) |

| | | | | | |
|---------------|-----------|---------|--|----------------|-----------------------|
| real-time PCR | 8,2 | 296 | Katzen mit respiratorischen Symptomen und Konjunktivitis | Deutschland | Gaston et al. (2004) |
| Zellkultur | 0 30,8 | 50 6 | Gesunde Katzen Katzen mit Konjunktivitis | Kanada | Shewen et al. (1980b) |
| Zellkultur | 28,7 | 101 | Katzen mit Konjunktivitis | Großbritannien | Wills et al. (1986) |

3.3.2. Tests

Verschiedene Methoden eignen sich zum Nachweis von *C.-felis*-AG und Chlamydien-spezifischer DNA. Hierzu zählen Ausstriche mit speziellen Färbemethoden, IFT, ELISA, Anzucht in verschiedenen Zellkulturen und PCR (SELBITZ, 2002). Für einen sensitiven und spezifischen Nachweis von *C. felis* haben PCR Methoden immer mehr an Bedeutung gewonnen und sind mittlerweile unverzichtbar.

3.3.2.1. Direktausstriche

Eine direkte Diagnose einer *C.-felis*-Infektion ist anhand zytologischer Identifikation der Einschlusskörperchen innerhalb des Zytoplasmas von konjunktivalen Epithelzellen möglich (RAMSEY, 2000). Dazu werden die Epithelzellen mittels scharfen Löffels gewonnen, auf einem Objektträger ausgestrichen und getrocknet (VON BOMHARD et al., 2003). Danach erfolgt eine Giemsa-, eine modifizierte Wright-Giemsa- („Quick Diff“), eine Macchiavello- oder eine Papanicolaou-Färbung. Die Giemsa-Färbung gilt dabei als die zu präferierende Methode (SYKES, 2014b). Die Einschlusskörperchen sind als Gruppen oder Cluster im Zytoplasma in der gleichen Ebene wie der Nukleus erkennbar (PEDERSEN, 1988). Am häufigsten sind diese Einschlüsse in den ersten zwei Wochen der Infektion sichtbar; mit zunehmender Chronizität nimmt ihre Anzahl ab (RAND, 2006). Nachteile des Direktausstriches sind, dass sowohl Melaningranula im Zytoplasma von konjunktivalen Epithelzellen (SYKES, 2014b) als auch „blue bodies“, hervorgerufen durch die lokale Anwendung von Neosporin (VON BOMHARD et al., 2003), zu falsch-negativen Ergebnissen führen können. Akute Infektionen sind in der Regel mittels des Direktausstrichs und dem Nachweis von Einschlusskörperchen kurz nach Auftreten von klinischen Symptomen (zwei bis neun Tage) nachweisbar (HOOVER et al., 1978). Im Gegensatz dazu sind bei chronischen Infektionen meist keine Einschlusskörperchen in Direktausstrichen detektierbar (CELLO, 1971a; NASISSE et al., 1993).

3.3.2.2. Immunfluoreszenz von Direktausstrichen (IFT)

Beim direkten IFT (*Chlamydia*-antigen-VET immunofluorescence test) zur Detektion von *C. felis* werden Direktausstriche von Konjunktivaltupfern angefertigt und mit Azeton fixiert (HALANOVA et al., 2011). Eine Antiserum-Lösung mit monoklonalen oder polyklonalen AK, welche an ein Fluorochrom (Fluoresceinisothiocyanat = FITC) gekoppelt sind, wird auf den Objektträger appliziert und inkubiert. Das Ergebnis gilt als positiv, wenn im Fluoreszenzmikroskop EK und RK einer bestimmten Größe dargestellt werden und ein fluoreszierendes grünes Licht zu erkennen ist (GERHARDT et al., 2006). Der IFT kann aufgrund einer zu geringen Anzahl an EK negativ ausfallen (WOOD & TIMMS, 1992). Die Dauer der Erkrankung scheint zudem einen Einfluss auf die Ausscheidung und Detektion von EK zu haben, da bei Katzen mit chronischer Konjunktivitis nur eine geringe Anzahl an EK nachgewiesen werden kann (NASISSE et al., 1993). Der direkte IFT hat sich im Vergleich zur Erregerkultivierung als sensitiver erwiesen (GERHARDT et al., 2006). In einer Studie von HARTMANN und Mitarbeitern (2010) konnte *C. felis* mittels PCR bei 56 % der Katzen, mittels IFT jedoch nur bei 43 % der Katzen detektiert werden. Somit zeigte die PCR eine höhere Sensitivität. Für den IFT konnte eine Sensitivität und Spezifität von 50 % und 64 % ermittelt werden (HARTMANN et al., 2010).

3.3.2.3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Es wurden verschiedene humanmedizinische ELISA-Testsysteme für den Nachweis von *C. trachomatis*-AG zur Detektion von Chlamydien in der Tiermedizin verwendet (WILLS et al., 1986; SANDERSON & ANDERSEN, 1989; POINTON, 1994). Bei dem direkten ELISA wird das Lipopolysaccharid von *C. trachomatis* nachgewiesen, ein gruppenspezifisches AG, welches bei verschiedenen Mitgliedern des Genus *Chlamydia* vorkommt (SYKES et al., 1999b). Allgemein sind nicht alle für die Humanmedizin entwickelten Testsysteme für den Nachweis von *C. felis* geeignet und variieren stark in ihrer Sensitivität und Spezifität (WILLS et al., 1986; POINTON, 1994; GRUFFYDD-JONES et al., 1995). WILLS und Mitarbeiter (1986) verglichen einen kommerziellen direkten ELISA-Test aus der Humanmedizin mit der Erregerkultivierung. Dabei erwies sich der ELISA zur Detektion von *C. felis*-AG aus konjunktivalen Tupfern im Vergleich zur Kultivierung innerhalb der ersten 41 Tage nach Exposition als gleichwertig sensitiv. Im weiteren zeitlichen Verlauf konnte dann aber eine geringere Sensitivität des ELISA festgestellt werden (WILLS et al., 1986). Eine Limitation des Tests ist, dass Kreuzreaktionen mit anderen gramnegativen Bakterien auftreten können (SANDERSON & ANDERSEN, 1989). THIELE und Mitarbeiter (1992) entwickelten aus diesem Grund für die Detektion von *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*) ein capture-ELISA-

System, bei welchem durch die Behandlung mit Proteinase-K die Bindung der AK über die konstante Bindungsstelle, den Fc-Teil, an unspezifisches AG ausgeschlossen wurde. Dadurch können Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien durch Kontamination der Probe und damit falsch-positive Ergebnisse verhindert werden (THIELE et al., 1992). Dieser *capture*-ELISA erwies eine gleichwertige Sensitivität wie die durchgeführte VI. Aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität des ELISA im Vergleich zu Zellkultur, IFT und der PCR werden jedoch andere direkte Nachweisverfahren bevorzugt (SYKES & GREENE, 2012).

3.3.2.4. Kultureller Nachweis

Vor der Entwicklung von DNA-basierten diagnostischen Tests galt die Erregerkultivierung als Goldstandard zur Diagnose von *C. felis* (EVERETT, 2000; SYKES & GREENE, 2012). Früher wurde die Erregeranzüchtung im Dottersack embryonierter Hühnereier durchgeführt, welche aber sehr kosten- und zeitintensiv war (PEDERSEN, 1988). Heutzutage wird *C. felis* meist in McCoy-Zellen angezüchtet. Zudem wächst der Erreger auf Mäuse-, Affen- und humanem Zellrasen (GAILLARD et al., 1984; EVERETT, 2000). Dazu wird eine Tupferprobe in ein geeignetes Transportmedium überführt und inkubiert (SYKES & GREENE, 2012). Danach werden die mit Cycloheximid vorbehandelten McCoy-Zellen auf Glasplatten aufgetragen, mit dem Erreger beimpft und nochmals inkubiert (RICHMOND, 1974; WILLS et al., 1987). Die Isolate können dann anhand genetischer Typisierungsmethoden differenziert werden (SYKES & GREENE, 2012). In einer Studie von SYKES und Mitarbeitern (1999b) konnte für die Kultivierung von *C. felis* bei Katzen mit klinischen Symptomen eine Sensitivität von 79 %, bei Katzen mit akuten Symptomen (< 28 Tage) von 100 % und bei Katzen mit chronischen Symptomen (> 28 Tage) von 48 % ermittelt werden. Der kulturelle Nachweis ist jedoch nur limitiert für die Praxis einsetzbar, da die Kultivierung viel Zeit benötigt, vom Vorhandensein lebensfähiger Chlamydien abhängt und zudem spezielle Transportmedien zur Tupferprobenentnahme nötig sind (THIELE et al., 1992; SYKES et al., 1999b).

3.3.2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wird heutzutage zum Nachweis von *C. felis*-DNA in veterinärmedizinischen Laboren als Standardmethode angewandt (VON BOMHARD et al., 2003; GRUFFYDD-JONES et al., 2009). Am häufigsten wird dabei das Chlamydien-spezifische outer-membrane-protein-A- (*ompA*) Gen, welches das MOMP kodiert, nachgewiesen (SYKES et al., 1997a; MCDONALD et al., 1998; SYKES et al., 1999a; MOCHIZUKI et al., 2000; HELPS et al., 2001). Mittels PCR-Methoden kann eine Klassifizierung der verschiedenen Mitglieder der

Ordnung *Chlamydiales* erfolgen, indem die ribosomalen Untereinheiten 16S des rRNA-Gens und 23S des rRNA-Gens mit spezifischen Primern nachgewiesen werden (PETTERSSON et al., 1997; PUDJIATMOKO et al., 1997; GORDANA et al., 2010). Dadurch kann zwischen *C. felis*-DNA und anderer chlamydialer DNA in den zu untersuchenden Proben unterschieden werden (VON BOMHARD et al., 2003). Die k. PCR hat jedoch den Nachteil, dass eine Kontamination der Amplifikate auftreten kann, welche zu falsch-positiven Ergebnissen führt (MCDONALD et al., 1998; SYKES et al., 1999b). Außerdem kann keine exakte Quantifizierung der Template-Zahl im Reaktionsgemisch erfolgen (HELPS et al., 2001). HELPS und Mitarbeiter (2001) entwickelten eine real-time PCR zur Quantifizierung von *C. felis*. Dabei wurde zusätzlich der *C. felis*-molecular-beacon angewandt, ein fluoreszierender Primer, welcher zur Reduktion von falsch-positiven Ergebnissen führt. Dabei erwies die real-time PCR eine zehn- bis 100-fach höhere Sensitivität im Vergleich zur zuvor durchgeführten n. PCR (HELPS et al., 2001). In weiteren Studien wurden eine multiplex-real-time PCR zum Nachweis von *C. felis*, FHV-1 und der feline 28S-ribosomalen DNA aus Konjunktivalzellen entwickelt (HELPS et al., 2003) sowie eine triplex-RT-PCR zum Nachweis von FCV, FHV-1 und *C. felis* (SYKES et al., 2001). Im Vergleich ergab sich zwischen der triplex- und der duplex-PCR kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Nachweishäufigkeit von *C. felis* (SYKES et al., 2001). Diese PCR-Methoden ermöglichen eine gleichzeitige Detektion mehrerer Pathogene unter Vermeidung von falsch-negativen Ergebnissen und sind aufgrund ihrer Sensitivität und Effizienz für die Routinediagnostik geeignet (HELPS et al., 2003; HELPS et al., 2005).

Im Vergleich zur Erregerkultivierung ist die PCR eine schnellere und kostengünstigere Methode (SYKES, 2014b). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Sensitivität von PCR und Kultivierung bei akut kranken Katzen ähneln, die PCR aber bei Katzen mit klinischen Symptomen über einem Monat die sensitivere Methode zum Nachweis von *C. felis* darstellt (SYKES et al., 1999b). In dieser experimentellen Studie konnte für die PCR bei Katzen mit klinischen Symptomen eine Sensitivität von 89,2 %, bei akut kranken Tieren (< 28 Tage) von 100 % und bei chronisch kranken Katzen (> 28 Tage) von 73 % ermittelt werden (SYKES et al., 1999b). Ein weiterer Vorteil zu anderen Nachweisverfahren wie der Kultivierung, welche nur lebende Pathogene nachweisen können, ist, dass *C. felis* noch innerhalb der ersten Tage nach Beginn einer Antibiotikatherapie in der PCR detektiert werden kann (SYKES et al., 1999b; DEAN et al., 2005). In einer Studie von SANDMEYER und Mitarbeitern (2010) konnten in drei verschiedenen Laboren bei Anwendung von unterschiedlichen PCR-Methoden für den Nachweis von *C. felis* Sensitivitäten von 100 %, 17

% und 0 % ermittelt werden. Die Spezifität für die PCR dagegen war mit 93 %, 98 % und 76 % für alle drei Labore eher hoch (SANDMEYER et al., 2010). Ein durch PCR ermitteltes positives *C. felis*-Ergebnis sollte immer im Zusammenhang mit Anamnese, klinischen Symptomen und Ansprechbarkeit auf Therapie interpretiert werden, da auch subklinisch infizierte Katzen in der PCR positiv getestet werden können (SYKES, 2014b).

III. VERÖFFENTLICHUNG

Online veröffentlicht im „Journal of Feline Medicine and Surgery“ am 06.02.2015

Original Article



Sampling sites for detection of feline herpesvirus-1, feline calicivirus and *Chlamydia felis* in cats with feline upper respiratory tract disease

Journal of Feline Medicine and Surgery
1–8
© ISFM and AAFP 2015
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1098612X15569615
jfms.com
 SAGE

Catharina Schulz¹, Katrin Hartmann¹, Ralf S Mueller¹,
Chris Helps² and Bianka S Schulz¹

Abstract

Objectives Feline herpesvirus-1 (FHV-1), feline calicivirus (FCV) and *Chlamydia felis* are involved in feline upper respiratory tract disease (FURTD). Clinical signs caused by these agents can overlap, and the involvement of certain pathogens is often unpredictable. The objectives of this study were to compare detection rates of FHV-1, FCV and *C felis* at different sampling sites, and to investigate the correlation between positive test results and clinical signs in cats with FURTD.

Methods Swabs were taken from the nose, pharynx, tongue and conjunctiva of 104 cats with signs of FURTD. Real-time PCR was performed on all samples for the detection of FHV-1, FCV and *C felis*.

Results Infectious agents were identified in 93 (89.4%) cats. Of these, 55.8% were positive for FHV-1, 50.0% for FCV and 35.6% for *C felis*. FCV was found more frequently in the oropharynx (92.3% of FCV-positive cats) and on the tongue (90.4%) than the conjunctiva (38.5%) ($P < 0.001$). There was no significant difference between the four sampling sites for the detection of FHV-1 and *C felis*. If nasal samples had also been taken, 94.9% of FHV-1-positive cats, 96.2% of FCV-positive cats and 81.1% of *C felis*-positive cats would have been detected.

Conclusions and relevance The oropharynx can be recommended as the preferred single sampling site for the detection of FCV, FHV-1 and *C felis* if only one sample can be taken; however, taking samples at different sites significantly increases the detection rate for all pathogens studied. Interestingly, sampling from a site with FURTD-associated lesions did not increase the likelihood of detecting the infectious agents.

Accepted: 17 December 2014

Introduction

Feline upper respiratory tract disease (FURTD) remains a significant problem, despite the widespread use of vaccination over the last 30 years.¹ It is usually caused by feline calicivirus (FCV), feline herpesvirus (FHV)-1² or *Chlamydia felis*.³ Common clinical signs of FURTD include nasal and ocular discharge, sneezing, dyspnoea and coughing.⁴ In addition, oral ulcerations are often observed in cats with FCV infection,⁵ and dendritic corneal ulcers can occur in cats infected with FHV-1.^{6,7} *C felis* mainly causes acute or chronic conjunctivitis and blepharospasm with serous or mucopurulent ocular discharge.^{8–10}

A presumptive diagnosis of the pathogen(s) involved in FURTD is commonly established based on the presence or absence of certain clinical signs; however, there is considerable overlap in clinical signs between the three

pathogens, and mixed infections can occur.^{11–13} As a consequence, the pathogens involved in FURTD can only be definitively identified by laboratory tests, which can be used to guide anti-infective treatment, such as antiviral drugs or antibiotics, and to control the infections in multi-cat households.

¹Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Munich, Germany

²Molecular Diagnostic Unit, Langford Veterinary Services, University of Bristol, Bristol, UK

Corresponding author:

Catharina Schulz DVM, Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Veterinaerstr 13, D-80539 Munich, Germany
Email: c.schulz@medizinische-kleintierklinik.de

PCR for detection of FHV-1 and *C felis*, and reverse transcriptase PCR (RT-PCR) for detection of FCV are considered rapid, sensitive and inexpensive.¹⁴ Some studies have shown that PCR has a higher sensitivity than virus isolation and enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of FHV-1, FCV and *C felis*.^{15–19}

The aim of this study was to compare four different sampling sites for detection of FHV-1, FCV and *C felis* by PCR or RT-PCR (FCV) in cats with FURTD in order to identify a preferred sampling site for each pathogen. Furthermore, the correlation between clinical signs and detection site was investigated for the three pathogens.

Material and methods

Patients

In the study, 104 cats with signs of FURTD that were presented to the Clinic of Small Animal Medicine of the LMU University of Munich between July 2012 and October 2013 were included. All cats were included because they were suspected of having FHV-1, FCV-, or *C felis*-related disease. These cats consisted of a population of first-opinion and referral cases. Cats were eligible to enter the study if they had at least one clinical sign of FURTD, including upper respiratory or ocular signs. Respiratory signs included nasal discharge, sneezing, and ulceration of the pharynx or tongue. Ocular signs included conjunctivitis, ocular discharge, keratitis and dendritic corneal ulcers. Clinical signs of conjunctivitis were defined as hyperaemia, chemosis, epiphora or ocular discharge. Both treated (antibiotics, anti-inflammatories, mucolytic therapy, pain medication, L-lysine) and vaccinated cats were included, as were cats with acute, as well as chronic, disease. Information regarding breed, age, sex, vaccination status, housing, duration of clinical signs, additional diseases and current therapy were documented using a standardised protocol for each cat. A general physical examination and specific examination of the respiratory tract were performed on each cat. All parameters were documented in a standardised questionnaire. A clinical scoring system was used that evaluated clinical parameters on a scale of 0 (absent) to 3 (severe). The subdivision of the cats into the groups 'mildly', 'moderately' and 'severely' affected was performed based on a scoring system that was previously published in an earlier study.²⁰ A complete ophthalmic examination was performed in 6/7 (85.7%) cats with keratitis.

Sample technique

Within 48 h of admission, four dry cotton-tipped swabs per cat were collected, one each from the nasal cavity, the conjunctiva, the tongue and the oropharynx. Sampling was always performed on the side showing more severe clinical signs. If there was no difference between both sides, the left side was sampled. Nasal swabs were obtained by gently rolling the sterile swab in the anterior

aspect of the nares after removing any excess mucous. Pharyngeal swabs were obtained by gently rotating the swab in the caudal oropharynx, trying to avoid contact with the tongue. The conjunctival swab was rolled along the ventral conjunctival fornix. No ocular anaesthetic was used when collecting the conjunctival swabs. The anterior tip of the tongue was sampled by rolling the swab on the mucosa. Samples were stored at -20°C until analyses were performed.

PCR

For isolation of total nucleic acid (DNA and RNA), the Nucleospin Blood kit (Macherey Nagel) was used. Cotton swabs were placed in a solution of 200 μl phosphate-buffered saline (Carl Roth), 200 μl buffer BQ1 and 20 μl proteinase K. Swabs were incubated at 70°C for 15 mins with shaking at 700 rpm (Vortemp 56; Labnet), after which the manufacturer's protocol was followed. Total nucleic acid was eluted with 100 μl of biotin elution buffer and stored at -80°C .

A quantitative PCR (qPCR) for FHV-1 and a qRT-PCR for FCV were performed as described previously²¹ – both included internal amplification controls. A qPCR to detect *C felis* and feline 28S rDNA (endogenous internal control) was set up as follows: 12.5 μl of $2 \times$ GoTaq PCR Master Mix (Promega), 200 nM each of 28S rDNA forward and reverse primers, 200 nM each of *C felis* forward and reverse primers, 50 nM 28S rDNA Texas Red-BHQ2 probe, 50 nM *C felis* FAM-BHQ1 probe (sequences described previously²²), 4.5 mM MgCl_2 final concentration, 5 μl genomic DNA and water to 25 μl . The reaction was run in an Agilent MX3005P and incubated at 95°C for 2 mins followed by 45 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at 60°C . Fluorescence was detected at 520 nm and 610 nm at each annealing step (60°C).

All qPCR data were analysed using the Agilent MX3005P software.

Statistical evaluation

For statistical analysis, GraphPad Prism was used. Fisher's exact test was used for all comparisons. At first, a global *P* value was determined (2×4 contingency table), followed by post hoc analysis if a global significant difference between all four sampling sites was detected. Two sampling sites were compared in 2×2 cross tables. The level of significance was set at $P < 0.05$ for these comparisons. An adjustment with a Bonferroni correction was used for the comparison of all four sampling sites (giving a total of six comparisons), leading to a level of significance of $P < 0.008$.

Results

Signalment and clinical signs

The study included 94 domestic shorthair cats, one domestic longhair and nine purebred cats (five

Table 1 Detection rates of feline herpesvirus (FHV)-1, feline calicivirus (FCV) and *Chlamydia felis* in cats with clinical signs of feline upper respiratory tract disease (n = 104) at different sampling sites (pharynx, tongue, nose and conjunctiva) and number of positive swabs (total number of swabs = 416)

| | FHV-1 | FCV | <i>C felis</i> |
|---------------------------------------|-----------------------|--|-----------------------|
| Total detection rate | 58 (55.8) | 52 (50.0) | 37 (35.6) |
| Total number of positive swabs | 164 (39.4) | 151 (36.3) | 89 (21.4) |
| Sampling sites | | | |
| Pharynx [95% CI] | 40 (69.0) [56.2–79.4] | 48 (92.3) [81.8–97.0]* | 25 (67.6) [51.5–80.4] |
| Tongue [95% CI] | 41 (70.7) [57.9–80.8] | 47 (90.4) [79.4–95.8]† | 17 (45.9) [31.0–61.6] |
| Nose [95% CI] | 47 (81.0) [69.1–89.1] | 36 (69.2) [55.7–80.0] | 22 (59.5) [43.5–73.7] |
| Conjunctiva [95% CI] | 36 (62.0) [49.2–73.4] | 20 (38.5) [26.5–52.0]† | 25 (67.6) [51.5–80.4] |
| <i>P</i> value | >0.05 | <0.0001* <0.0001† Other comparisons: >0.05 | >0.05 |

Values are given as n (%) unless otherwise indicated

*Comparison between detection rates of FCV in pharynx and conjunctiva

†Comparison between detection rates of FCV in tongue and conjunctiva

CI = confidence interval

Siamese, two Maine Coon, one British Shorthair, one Persian). Thirty-two (30.8%) cats were female intact, 17 (16.3%) were female spayed, 29 (27.8%) were male intact and 26 (25.1%) were male neutered. The age of the cats was between 4 weeks and 19 years (median 6 months).

Of all 104 cats, 35 (34.0%) lived in public or private animal shelters, 21 (20.2%) in multi-cat colonies on farms and 40 (38.8%) were client-owned. Eight cats (7.7%) were strays. Most cats (86.4%) lived in multi-cat households. Fourteen of 104 cats had been treated with oxytetracycline eye ointment at the time of presentation, one cat with oral doxycycline, 10 with subcutaneous enrofloxacin and two with oral pradofloxacin.

Most cats showed more than one clinical sign. Eighty-six (82.7%) cats showed nasal discharge, 85 (81.7%) showed sneezing, 83 (79.8%) showed ocular discharge, 16 (15.4%) showed oral ulcerations, 56 (53.8%) showed conjunctivitis and seven (6.7%) showed keratitis. Further clinical abnormalities included lethargy (68/104; 65.4%), increased body temperature (13/104; 12.5%), reduced appetite (32/104; 30.8%), anorexia (10/104; 9.6%), tachypnoea (26/104; 25.0%), salivation (14/104; 13.5%) and gingivostomatitis (20/104; 19.2%). Lameness due to polyarthritis was observed in three (2.9%) cats. Clinical signs were assessed as moderate in 22.3% and as severe in 27.1% of cats. Fifty-seven (55.0%) cats had to be hospitalised. The duration of clinical signs was unknown for 35 (33.9%) cats; 37 (35.9%) had shown signs between 1 and 21 days, and 31 (30.0%) cats had signs of FURTD for more than 21 days.

Detection rates of FHV-1, FCV and *C felis*

Overall, 416 samples from four different sampling sites were available from 104 cats with FURTD. At least one

pathogen was detected in 93 (89.4%) cats. FHV-1 was detected in 58 (55.8%), FCV in 52 (50.0%) and *C felis* in 37 (35.6%) cats. Detection rates of the three pathogens at the four different sampling sites are displayed in Table 1. There was no significant difference in the detection of FHV-1 and *C felis* between the four sampling sites. For FCV, a global difference was detected between the four sampling sites ($P < 0.001$), with the virus being detected significantly more often from the oropharynx and from the tongue than from the conjunctiva ($P < 0.0001$).

Forty-six of 104 (46.2%) cats were infected with a single pathogen, with the remaining 47 (44.2%) pathogen-infected cats having multiple-pathogen infection. Infections with two pathogens were detected in 40/104 (37.5%) cats. The ratio of single-pathogen to multiple-pathogen infection was 28:30 for FHV-1, 10:42 for FCV and 8:29 for *C felis*. Table 2 shows the detection rates for multiple-pathogen infections at the different sampling sites. Co-infections of FCV and *C felis* were detected significantly more often in the pharynx than in the conjunctiva ($P = 0.001$). There was no difference between the sampling sites for the other multiple-pathogen infections.

Table 3 shows the number of locations for detection of the three pathogens. By taking only pharyngeal swabs for detection of the three pathogens, 18/58 (31.0%) FHV-1-positive cats would not have been identified, and 4/52 (7.7%) FCV-positive and 12/37 (32.4%) *C felis*-positive cats would have been missed.

Table 4 demonstrates single- or multiple-pathogen detection rates in cats with oral ulceration, conjunctivitis or keratitis. Results for cats infected with a single pathogen showing oral ulceration, conjunctivitis or keratitis are displayed in Table 5.

Table 2 Detection rates for multiple-pathogen infections in cats with clinical signs of feline upper respiratory tract disease at four different sampling sites (pharynx, nose, tongue and conjunctiva)

| Total detection rate | 18 (17.3) | 17 (16.3) | 5 (4.8) |
|-------------------------|----------------------|--|------------------------|
| Sampling sites | FHV-1 + FCV | FCV + <i>C felis</i> | FHV-1 + <i>C felis</i> |
| Pharynx [95% CI] | 8 (44.4) [24.6–66.3] | 13 (76.5) [52.7–90.4] [*] | 1 (20.0) [3.6–62.5] |
| Tongue [95% CI] | 9 (50.0) [29.0–71.0] | 10 (58.8) [36.0–78.3] | 1 (20.0) [3.6–62.5] |
| Nose [95% CI] | 8 (44.4) [24.6–66.3] | 8 (47.0) [26.2–69.0] | 2 (40.0) [11.8–76.9] |
| Conjunctiva [95% CI] | 4 (22.2) [9.0–45.2] | 4 (23.5) [9.6–47.3] [*] | 2 (40.0) [11.9–76.9] |
| <i>P</i> value [95% CI] | >0.05 | 0.001 [*] Other comparisons >0.05 | >0.05 |

Values given as n (%) unless otherwise stated

^{*}Comparison between detection rates of FCV and *C felis* multiple infection in pharynx and conjunctiva

FHV-1 = feline herpesvirus-1; CI = confidence interval; FCV = feline calicivirus; *C felis* = *Chlamydia felis*

Table 3 Detection rates of feline herpesvirus (FHV)-1, feline calicivirus (FCV) and *Chlamydia felis* on one, two, three and four locations in cats with respiratory tract disease

| Number of locations | FHV-1 (n = 58) | FCV (n = 52) | <i>C felis</i> (n = 37) |
|---------------------|----------------|--------------|-------------------------|
| 1 | 11 (19.0) | 5 (9.6) | 18 (48.6) |
| 2 | 12 (20.7) | 13 (26.9) | 1 (2.7) |
| 3 | 11 (18.7) | 16 (30.8) | 3 (8.1) |
| 4 | 24 (41.4) | 18 (34.6) | 15 (40.5) |

Values are given as n (%)

Table 4 Detection rates of feline herpesvirus (FHV)-1, feline calicivirus (FCV) and *Chlamydia felis* in cats infected with single or multiple pathogens, with clinical signs of oral ulcerations, conjunctivitis, keratitis or rhinitis

| Clinical signs | Total detection rates | FHV-1 | FCV | <i>C felis</i> | <i>P</i> value |
|---------------------------|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| Oral ulcerations [95% CI] | 16 (15.4) | 11 (68.7) [44.4–85.8] | 13 (81.2) [*] [56.0–93.4] | 5 (31.2) [*] [14.2–55.6] | 0.001 [*] |
| Conjunctivitis [95% CI] | 56 (53.8) | 30 (53.6) [40.7–66.0] | 30 (53.6) [40.7–66.0] | 28 (50.0) [37.3–62.7] | >0.05 |
| Keratitis [95% CI] | 7 (6.7) | 5 (71.4) [35.9–91.8] | 0 (0) [0–35.4] | 2 (28.6) [8.2–64.1] | >0.05 |
| Rhinitis [95% CI] | 61 (58.7) | 35 (57.4) [44.9–68.9] [†] | 30 (49.2) [37.1–61.4] | 21 (34.4) [†] [23.8–47.0] | 0.01 [†] |

Values are given as n (%) unless otherwise indicated

^{*}Comparison in cats with oral ulcerations between FCV infection and *C felis* infection

[†]Comparison in cats with rhinitis between FHV-1 infection and *C felis* infection

CI = confidence interval

Discussion

The aim of this study was to determine preferred sampling sites for the detection of FHV-1, FCV and *C felis* in cats with FURTD. Several previous studies have investigated the detection rates of these pathogens in cats with FURTD; however, this is the first study to compare data from four different sampling sites.

In this study there was no difference in the detection rates of FHV-1 between the different sampling sites. FHV-1 tended to be most frequently detected in the nose,

but this difference was not significant compared with other locations. This is in concordance with results of a previous study, in which the detection rates of FHV-1 in cats with FURTD obtained by pharyngeal and nasal swabs were almost identical.²³ This suggests that the pharynx and the nasal cavity are suitable sampling sites for the detection of FHV-1. However, while performing the current study it became obvious that nasal swabs were much more difficult to take than pharyngeal swabs, something that has previously been reported.²³

Table 5 Detection rates of feline herpesvirus (FHV)-1, feline calicivirus (FCV) and *Chlamydia felis* in cats infected with single pathogens with clinical signs of oral ulcerations, conjunctivitis, keratitis or rhinitis

| Clinical signs | Total detection rates | FHV-1 | FCV | <i>C felis</i> | P value |
|---------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|---|
| Oral ulcerations [95% CI] | 5 (4.8) | 1 (20.0) [3.6–62.5] | 3 (60.0) [23.1–88.2] | 1 (20.0) [3.6–62.5] | >0.05 |
| Conjunctivitis [95% CI] | 18 (17.3) | 12 (66.6) [43.8–83.7]* | 0 (0) [0–17.6]* | 6 (33.3) [16.3–56.3] | <0.0001* Other comparisons >0.05 |
| Keratitis [95% CI] | 5 (4.8) | 3 (60.0) [23.1–88.2] | 0 (0) [0–43.5] | 2 (40.0) [11.8–76.9] | >0.05 |
| Rhinitis [95% CI] | 26 (25.0) | 17 (65.4) [46.2–80.6]†‡ | 3 (11.5) [4.0–29.0]† | 6 (23.0) [11.0–42.1]‡ | <0.0001†0.004‡ Other comparisons >0.05 |

Values are given as n (%)

*Comparison in cats with conjunctivitis between FHV-1 infection and FCV infection

†Comparison in cats with rhinitis between FHV-1 infection and FCV infection

‡Comparison in cats with rhinitis between FHV-1 infection and *C felis* infection

CI = confidence interval

In this study, FCV was detected significantly more often on the pharynx and tongue compared with other locations. This was expected as a previous study had shown that in six cats experimentally infected with FCV the virus was isolated more frequently from pharyngeal swabs than from nasal and conjunctival swabs.²⁴ Two previous studies of cats with FURTD also demonstrated that more pharyngeal than conjunctival swabs were positive for FCV^{25,26} while in another study in cats with FURTD, there was no difference between conjunctival and pharyngeal swabs.¹⁴ However, the latter study only had a 9.6% detection rate for FCV.¹⁴ In contrast, in a report from Germany investigating 68 cats with FURTD, FCV was detected in 35.8% of pharyngeal swabs and in 44.0% of conjunctival swabs.²⁷ Most of these studies confirm the results of the present study, indicating that pharyngeal swabs, as well as swabs from the tongue, can be recommended as sampling sites for the diagnosis of FCV infection; however, 4/52 FCV-positive cats would have been missed by taking swabs only from the pharynx, and five FCV-positive cats would not have been detected by taking swabs only from the tongue. It was an unexpected finding of the present study that there was no difference between the four sampling sites with regard to the detection rate of *C felis*, as this pathogen was found in the oropharynx and conjunctiva with equal frequency. *Chlamydia felis* has been described predominately as a conjunctival pathogen in cats.^{9,10} Pharyngeal shedding of the organism has been previously described in cats with FURTD;²⁸ however, in contrast to results of the present study, detection of *C felis* has mostly been shown from conjunctival swabs.^{25,29}

The most common infectious agent detected in this study was FHV-1. Compared with previous studies, a

much higher prevalence of FHV-1 (55.8%), FCV (50.0%) and *C felis* (35.6%) was obtained.^{30–32} One explanation for this is the fact that four samples from different sites were collected from each animal, while previous studies established prevalence data based upon samples taken from one or two sites.^{14,23,30} It is also likely that the higher prevalence rates in the present study were owing to the selection of the cats showing signs of FURTD, with >50% of the cats showing moderate or severe clinical signs and requiring hospitalisation. Other studies have shown that the detection rates of FHV-1, FCV and *C felis* can vary depending on the severity of disease.^{33,34} In addition, 86.4% of cats in the present study originated from multi-cat households or animal shelters, and both crowding and hygiene status can influence the prevalence rates.²²

Dual or multiple infections with FHV-1, FCV and *C felis* were detected in half of the pathogen-positive cats, indicating that infections with more than one pathogen are very common in cats with FURTD. In previous studies, cats with *C felis* infection were commonly co-infected with FHV-1 or with FCV,^{14,35,36} while in the present study *C felis* infection was mostly accompanied by FCV infection. Furthermore, co-infections with FHV-1 and FCV were also commonly detected. Co-infection with FCV and *C felis* was detected more frequently in the pharynx; however, by sampling only this region, shedding of pathogens in other sampling sites would have been missed. Therefore, sampling multiple sites can be recommended for cats with single- and multiple-pathogen infections.

In cats with rhinitis, FHV-1 was detected more frequently than FCV and *C felis*, which agrees with results of previous investigations.^{20,37} Similar to previous studies,^{38–41} FCV tended to be detected more frequently than

other pathogens in cats with oral ulcerations, and FHV-1 tended to be the most prevalent pathogen in cats with keratitis;^{38–40} however, both differences were not statistically significant. Nevertheless, the small number of patients with oral ulcerations and keratitis has to be considered. In cats with conjunctivitis, FHV-1 was identified significantly more often than FCV, which is consistent with findings in other studies.^{22,35} *C felis* was detected as a single pathogen in six cats with rhinitis that did not show signs of conjunctivitis, indicating that *C felis* might be able to cause respiratory signs and not just conjunctivitis. In experimental studies, nasal discharge and sneezing has been observed in cats after infection with *C felis*.^{9,10,42} The low detection rate of *C felis* in cats with conjunctivitis might have been influenced by previous treatment with antibiotics. Therefore, it might be possible that *C felis*, even though the causative agent for conjunctivitis, was not shed at the time of sampling in some cats.

The fact that half of the cats were infected with more than one pathogen confounds interpretation of the clinical signs as they cannot be clearly attributed to a certain pathogen. When cats infected with a single pathogen were investigated (Table 5), conjunctivitis was associated with FHV-1-infection, although numbers of cats were very low; however, this could not be detected when clinical signs were evaluated in all cats infected with one or more pathogens (Table 4). It cannot be excluded that some cats were shedding infectious organisms, while their clinical signs were caused by other non-infectious problems such as nasal neoplasia and chronic rhinosinusitis, as cats with a chronic course of disease were also included in the study. The qPCR can only detect the presence of the organism, but cannot predict a relationship between infection status and clinical signs. To assess the relationship between infection with a certain organism and clinical disease, infection studies would be needed in an experimental setting.

While some cats were shedding FHV-1, FCV and *C felis* only in one location, almost equal numbers of cats were positive for one of the pathogens in two, three or four sampling sites. By taking samples from only the pharynx, 31.0% of FHV-1-positive, 7.7% of FCV-positive and 32.4% of *C felis*-positive cats would have been missed. If nasal samples had also been taken, 94.9% of FHV-1-positive cats, 96.2% of FCV-positive cats and 81.1% of *C felis*-positive cats would have been detected. By taking pharyngeal and conjunctival swabs, 89.2% of *C felis*-positive cats would have been detected. Therefore, it can be recommended to take a minimum of pharyngeal and nasal samples to increase the detection rates of these three pathogens.

The number of cats with keratitis and pharyngeal ulceration was relatively small; hence, it is not possible to make recommendations for preferred sampling sites.

Surprisingly, the detection rate of *C felis* in cats with conjunctivitis tended to be higher in the pharynx and nose than in the conjunctiva, but this difference was not significant, and the timing of sampling might have influenced detection. In an experimental study with 26 *C felis*-infected cats, the organism was isolated from the conjunctiva of all infected cats 3 days after inoculation and from the nose of all infected cats five days after inoculation.⁹ Therefore, sampling at different time points post-infection could result in different *C felis* detection rates at different sampling sites, although, to our knowledge, the temporal shedding of *C felis* in the oropharynx has not been investigated. In cats with nasal discharge, ocular discharge and sneezing, all single- or multiple-pathogen infections were detected more frequently in the pharynx than in the conjunctiva.

One limitation of the present study was the high number of patients with multiple infections, making associations between detection of a single pathogen and clinical signs difficult. Another limitation was the low number of patients with specific disease conditions, such as oral ulcerations and keratitis, which have been linked to infections with specific pathogens. Furthermore, detection of the pathogens might have been influenced by the fact that cats with acute, as well as chronic, illness were included in the study, and duration of illness was unknown in one-third of cats. In addition, some cats were pre-treated with systemic or local antimicrobials, which could have influenced pathogen detection rates in these cats.

Conclusions

The results obtained in this study have important clinical implications for veterinary practice. Data suggest that the pharynx should be the preferred sampling site for the detection of FHV-1, FCV and *C felis* in cats with FURTD, if only one sample can be taken. However, obtaining additional samples from other locations significantly increases the chance of detection for all three pathogens. Selection of the sampling site for detection of the three pathogens cannot be based on clinical signs alone.

Acknowledgements We thank the technicians at Langford Veterinary Services for processing the swabs and performing the quantitative PCRs and quantitative reverse transcriptase PCRs. We thank Dr Sven Reese for advice on statistical analysis.

Conflict of interest The authors do not have any potential conflicts of interest to declare.

Funding We thank the Clinic of Small Animal Medicine of the LMU University of Munich for providing financial support for the study.

References

- Radford AD, Gaskell RM and Dawson S. Feline viral upper respiratory disease. In: King LG (ed). *Textbook of respiratory disease in dogs and cats*. Missouri: WB Saunders, 2004, pp 271–283.
- Gaskell RM. Upper respiratory disease in the cat (including chlamydia): control and prevention. *Feline Pract* 1993; 21: 29–34.
- Sykes JE. Feline upper respiratory tract pathogens: herpesvirus-1 and calicivirus. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2001; 23: 166–177.
- Hoover EA, Rohovsky MW and Griesemer RA. Experimental feline viral rhinotracheitis in the germfree cat. *Am J Pathol* 1970; 58: 269–282.
- Flagstad A. Experimental picornavirus infection in cats. *Acta Vet Scand* 1973; 14: 501–510.
- Andrew SE. Ocular manifestations of feline herpesvirus. *J Feline Med Surg* 2001; 3: 9–16.
- Roberts SR, Dawson CR, Coleman V, et al. Dendritic keratitis in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 1972; 161: 285–289.
- Wills JM, Gruffydd-Jones TJ, Richmond SJ, et al. Effect of vaccination on feline *Chlamydia psittaci* infection. *Infect Immun* 1987; 55: 2653–2657.
- Masubuchi K, Nosaka H, Iwamoto K, et al. Experimental infection of cats with *Chlamydomydia felis*. *J Vet Med Sci* 2002; 64: 1165–1168.
- Hoover EA, Kahn DE and Langloss JM. Experimentally induced feline chlamydial infection (feline pneumonitis). *Am J Vet Res* 1978; 39: 541–547.
- Sykes JE, Browning GF, Anderson G, et al. Differential sensitivity of culture and the polymerase chain reaction for detection of feline herpesvirus 1 in vaccinated and unvaccinated cats. *Arch Virol* 1997; 142: 65–74.
- Cello RM. Clues to differential diagnosis of feline respiratory infections. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 158: 968–973.
- [No authors listed] Report of the panel of the colloquium on selected feline infectious diseases. *J Am Vet Med Assoc* 1970; 157: 2043–2051.
- Sykes JE, Allen JL, Studdert VP, et al. Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and *Chlamydia psittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. *Vet Microbiol* 2001; 81: 95–108.
- Burgesser KM, Hotaling S, Schiebel A, et al. Comparison of PCR, virus isolation, and indirect fluorescent antibody staining in the detection of naturally occurring feline herpesvirus infections. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 122–126.
- Rampazzo A, Appino S, Pregel P, et al. Prevalence of *Chlamydomydia felis* and feline herpesvirus 1 in cats with conjunctivitis in northern Italy. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 799–807.
- Reubel GH, Ramos RA, Hickman MA, et al. Detection of active and latent feline herpesvirus 1 infections using the polymerase chain reaction. *Arch Virol* 1993; 132: 409–420.
- Stiles J, McDermott M, Willis M, et al. Comparison of nested polymerase chain reaction, virus isolation, and fluorescent antibody testing for identifying feline herpesvirus in cats with conjunctivitis. *Am J Vet Res* 1997; 58: 804–807.
- Stiles J, McDermott M, Bigsby D, et al. Use of nested polymerase chain reaction to identify feline herpesvirus in ocular tissue from clinically normal cats and cats with corneal sequestra or conjunctivitis. *Am J Vet Res* 1997; 58: 338–342.
- Bannasch MJ and Foley JE. Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters. *J Feline Med Surg* 2005; 7: 109–119.
- Friedl Y, Schulz B, Knebl A, et al. Efficacy of passively transferred antibodies in cats with acute viral upper respiratory tract infection. *Vet J* 2014; 201: 316–321.
- Helps CR, Lait P, Damhuis A, et al. Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydomydia felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: experience from 218 European cat-teries. *Vet Rec* 2005; 156: 669–673.
- Veir JK, Ruch-Gallie R, Spindel ME, et al. Prevalence of selected infectious organisms and comparison of two anatomic sampling sites in shelter cats with upper respiratory tract disease. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 551–557.
- Kahn DE, Hoover EA and Bittle JL. Induction of immunity to feline calicivirus disease. *Infect Immun* 1975; 11: 1003–1009.
- Di Martino B, Di Francesco CE, Meridiani I, et al. Etiological investigation of multiple respiratory infections in cats. *New Microbiol* 2007; 30: 455–461.
- Marsilio F, Di Martino B, Decaro N, et al. A novel nested PCR for the diagnosis of calicivirus infections in the cat. *Vet Microbiol* 2005; 105: 1–7.
- Huebner J. Meine Katze hustet! Neues zum Thema “Katzenschnupfen” [article in German]. *Kleintierpraxis* 2008; 53: 390–392.
- Harley R, Day S, Di Rocco C, et al. The *Chlamydomydia felis* plasmid is highly conserved. *Vet Microbiol* 2010; 146: 172–174.
- Marsilio F, Di Martino B and Di Francesco C. Use of a duplex-PCR assay to screen for Feline Herpesvirus-1 and *Chlamydomydia* spp. in mucosal swabs from cats. *New Microbiol* 2004; 27: 287–292.
- Binns SH, Dawson S, Speakman AJ, et al. A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus. *J Feline Med Surg* 2000; 2: 123–133.
- Gaston JZ, Stengel C, Harbour D, et al. Prävalenz des feline Herpesvirus-1, feline Calicivirus und von *Chlamydomydia felis* in Mehrkatzenhaushalten [article in German]. *Kleintierpraxis* 2004; 33: 351–358.
- Adler K, Radeloff I, Stephan B, et al. Bacteriological and virological status in upper respiratory tract infections of cats (cat common cold complex) [article in German]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2007; 120: 120–125.
- Low HC, Powell CC, Veir JK, et al. Prevalence of feline herpesvirus 1, *Chlamydomydia felis*, and *Mycoplasma* spp DNA in conjunctival cells collected from cats with and without conjunctivitis. *Am J Vet Res* 2007; 68: 643–648.
- Vogtlin A, Fraefel C, Albini S, et al. Quantification of feline herpesvirus 1 DNA in ocular fluid samples of clinically diseased cats by real-time TaqMan PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 519–523.
- Helps C, Reeves N, Egan K, et al. Detection of *Chlamydomydia felis* and feline herpesvirus by multiplex real-time PCR analysis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2734–2736.
- Cai Y, Fukushi H, Koyasu S, et al. An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan. *J Vet Med Sci* 2002; 64: 215–219.

- 37 Burns RE, Wagner DC, Leutenegger CM, et al. **Histologic and molecular correlation in shelter cats with acute upper respiratory infection.** *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2454–2460.
- 38 Knowles JO, McArdle F, Dawson S, et al. **Studies on the role of feline calicivirus in chronic stomatitis in cats.** *Vet Microbiol* 1991; 27: 205–219.
- 39 Dean E and Meunier V. **Feline eosinophilic keratoconjunctivitis: a retrospective study of 45 cases (56 eyes).** *J Feline Med Surg* 2013; 15: 661–668.
- 40 Hoover EA and Kahn DE. **Experimentally induced feline calicivirus infection: clinical signs and lesions.** *J Am Vet Med Assoc* 1975; 166: 463–468.
- 41 Gerriets W, Joy N, Huebner-Guthardt J, et al. **Feline calicivirus: a neglected cause of feline ocular surface infections?** *Vet Ophthalmol* 2012; 15: 172–179.
- 42 Sykes JE, Studdert VP, Anderson G, et al. **Comparison of *Chlamydia psittaci* from cats with upper respiratory tract disease by polymerase chain reaction analysis of the *ompA* gene.** *Vet Rec* 1997; 140: 310–313.

IV. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden bei Katzen mit Katzenschnupfen die vier Lokalisationen Nase, Rachen, Zunge und Konjunktiva zum Nachweis der Erreger FHV-1, FCV und *C. felis* miteinander verglichen, um geeignete Lokalisationen zur Tupferprobenentnahme zu bestimmen. Bisher hat sich keine Studie mit dieser Fragestellung beschäftigt.

Es konnte gezeigt werden, dass zum Nachweis des FCV der Rachen und die Zunge die am besten geeigneten Lokalisationen zur Probenentnahme darstellen. FCV konnte sowohl im Rachen (bei 92,3 % der FCV-positiven Katzen) als auch auf der Zunge (90,4 %) signifikant häufiger als auf der Konjunktiva (38,5 %) nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde bereits in zwei früheren Studien bestätigt. In diesen konnte FCV bei Katzen mit Katzenschnupfen häufiger im Rachen als von der Konjunktiva isoliert werden (MARSILIO et al., 2005; DI MARTINO et al., 2007). Eine weitere Studie mit sechs experimentell FCV-infizierten Katzen bestätigt ebenfalls das Ergebnis dieser Arbeit, da auch in dieser Studie das Virus im Rachen häufiger als in der Nase und auf der Konjunktiva nachzuweisen war (KAHN et al., 1975). In einer anderen Studie dagegen konnte FCV bei Katzen mit Katzenschnupfen gleichermaßen häufig im Rachen und auf der Konjunktiva detektiert werden (SYKES et al., 2001).

Für FHV-1 ergab sich kein Unterschied in der Nachweishäufigkeit an den verschiedenen Lokalisationen. FHV-1 wurde bei 81,0 % der Katzen am häufigsten in der Nase nachgewiesen. Bei 70,7 % und 69,0 % der FHV-1-positiven Katzen konnte der Erreger von der Zunge und aus dem Rachen isoliert werden. Im Vergleich zu den anderen Lokalisationen erwies sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied. Die in dieser Studie ermittelten Nachweiskraten in Rachen und Nase stimmen mit denen einer früheren Studie überein, in welcher FHV-1 sowohl im Rachen als auch in der Nase gleichermaßen häufig detektiert werden konnte (VEIR et al., 2008). Verschiedene Punkte befürworten jedoch eine Tupferentnahme von der Zunge oder aus dem Rachenraum. Besonders bei Katzenwelpen erwies sich die Probenentnahme aus der Nase in der vorliegenden Studie aufgrund des kleinen Umfangs der Nasenlöcher als schwierig. Zudem wurde die Entnahme aus dem Rachen von den meisten Katzen besser toleriert. Diese Beobachtungen wurden von anderen Autoren bereits in einer früheren Studie beschrieben (VEIR et al., 2008).

C. felis konnte in der vorliegenden Studie sowohl im Rachen als auch auf der Konjunktiva bei

67,6 % der Katzen am häufigsten nachgewiesen werden. Auch hier bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den vier Lokalisationen. Ein interessantes Ergebnis der Studie war, dass *C. felis*, welches allgemein als ein Konjunktivitiserreger angesehen wird (CELLO, 1971a; SHEWEN et al., 1980b; MASUBUCHI et al., 2002; WIELICZKO & PLONECZKA-JANECZKO, 2010), im Rachen ebenso häufig wie auf der Konjunktiva nachzuweisen war. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das Pathogen von der Konjunktiva über den Tränen-Nasenkanal durch Abschlucken in den Rachen gelangt. In einer früheren Studie konnte zwar bereits nachgewiesen werden, dass *C. felis* im Rachen von Katzen mit Katzenschnupfen detektiert werden kann (BURNS et al., 2011), das Ausscheidungsverhalten des Erregers wurde jedoch nicht, wie in der vorliegenden Untersuchung, im Vergleich zu anderen Lokalisationen untersucht. Dagegen konnte *C. felis* in zwei weiteren Studien bei Katzen mit Katzenschnupfen nur aus der Konjunktiva und nicht aus dem Rachen detektiert werden (MARSILIO et al., 2004; DI MARTINO et al., 2007).

FHV-1 wurde in der vorliegenden Studie bei 55,8 % der Katzen nachgewiesen und war somit das am häufigsten nachgewiesene Pathogen. In einer Studie aus Deutschland konnte FHV-1 mittels PCR nur bei 18,3 % der Katzen mit respiratorischen Symptomen detektiert werden (GASTON et al., 2004). In einer Studie von BURNS und Mitarbeitern (2011) konnte FHV-1 sogar bei 91,0 % der Katzen mit Katzenschnupfen nachgewiesen werden, FCV dagegen nur bei 23,0 % der eingeschlossenen Katzen. In älteren Untersuchungen wurden FHV-1 und FCV mit ähnlicher Häufigkeit bei Katzen mit respiratorischen Symptomen isoliert (POVEY & JOHNSON, 1971; JENSEN et al., 1977; BECH-NIELSEN et al., 1980). Andere aktuelle Studien hingegen ergaben eine höhere Prävalenz für FCV bei Katzen mit Katzenschnupfen (BINNS et al., 2000; MOCHIZUKI et al., 2000; CAI et al., 2002; HELPS et al., 2005; ZICOLA et al., 2009). Gründe für eine höhere Prävalenz von FCV können zum einen die weitläufig durchgeführten Impfungen sein, die einen guten Schutz gegen eine FHV-1-induzierte Erkrankung bieten (SYKES, 2014a), jedoch aufgrund der genetischen Variabilität nicht gegen alle FCV-Subtypen schützen (HOHDATSU et al., 1999; RADFORD et al., 2006). Zum anderen scheiden FCV-infizierte Katzen den Erreger permanent aus, während FHV-1 nur intermittierend, typischerweise nach Stressepisoden, ausgeschieden wird (POVEY, 1979a). Latent FHV-1-infizierte Katzen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Viren ausscheiden, sind daher durch den hier durchgeführten Erregernachweis nicht identifizierbar. Ein Grund für die vergleichsweise hohe Nachweisrate von FHV-1 in der vorliegenden Studie kann die geringe Rate an geimpften Katzen von nur 46,6 % in der Studienpopulation sein.

FCV konnte in dieser Studie bei 50,0 % der Katzen nachgewiesen werden. In einer Studie aus

Deutschland konnte FCV bei 57,6 % der kranken Katzen mittels PCR detektiert werden (GASTON et al., 2004). Insgesamt liegen die Nachweisraten beider Viren aber höher als in anderen Studien (SYKES, 2001; HOLST et al., 2005; ZICOLA et al., 2009). Eine Erklärung für die hohe Prävalenz beider Viren könnte die Tatsache sein, dass die Tupferproben für den Virusnachweis von vier verschiedenen Lokalisationen genommen wurden. Die meisten Prävalenzdaten wurden in anderen Studien nur anhand einer (BINNS et al., 2000) oder zwei Lokalisationen (SYKES et al., 2001; VEIR et al., 2008) erhoben. Ein weiterer Grund könnte die Wahl des Nachweisverfahrens sein. In vorangegangenen Studien wurde häufig die Virusisolierung als Nachweisverfahren angewendet (COUTTS et al., 1994; BINNS et al., 2000). Die in der vorliegenden Studie verwendete PCR weist jedoch eine höhere Sensitivität für den Nachweis von FHV-1 und FCV auf (BURGESSER et al., 1999; RAMPAZZO et al., 2003). Zudem stammte der größte Teil der untersuchten Katzen (86,4 %) aus Mehrkatzenhaushalten oder Tierheimen, in denen die Erregerprävalenz aufgrund des engen Kontaktes und mangelnder Hygiene meist höher ist (HELPS et al., 2005).

Bei 35,6 % der Katzen konnte in der vorliegenden Untersuchung *C. felis* nachgewiesen werden. Die Prävalenz liegt damit höher als in den meisten vorangegangenen Studien (MCDONALD et al., 1998; GASTON et al., 2004; ADLER et al., 2007). Gründe dafür sind auch für diesen Erreger die Tupferentnahme von vier Lokalisationen und der große Anteil von Katzen aus Mehrkatzenhaushalten (GASTON et al., 2004). Weiterhin könnte auch das Alter der Tiere ein Einflussfaktor sein. Studien konnten zeigen, dass mit zunehmendem Alter das Risiko für eine *C. felis*-Infektion abnimmt (WILLS et al., 1988; RAMPAZZO et al., 2003). Für Katzen zwischen zwei und sechs Monaten wurde ein höheres Risiko für eine Infektion mit *C. felis* ermittelt als für Katzen über einem Jahr. Bei Katzen, die jünger als acht Wochen sind, ist aufgrund der passiven maternalen Immunisierung eine Infektion dagegen unwahrscheinlich (SYKES & GREENE, 2012). Von den in die Studie eingeschlossenen Katzen waren 45 Tiere zwischen zwei und sechs Monaten alt und ein großer Teil der Katzen unter acht Wochen stammte vom Bauernhof und wies somit möglicherweise einen nicht ausreichenden Spiegel an maternalen Antikörpern auf, was eine Infektion begünstigen könnte. Eine weitere Erklärung für die hohen Nachweisraten aller drei Erreger ist, dass nur Katzen mit klinischen Symptomen beprobt wurden und der Schweregrad der Erkrankung bei über 50,0 % der Tiere als mittelgradig und hochgradig eingestuft wurde. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz der drei Pathogene unter anderem auch vom Schweregrad der Erkrankung abhängt (VOGTLIN et al., 2002; LOW et al., 2007).

In der vorliegenden Studie wurden bei der Hälfte der Katzen mit positivem Erregernachweis

Infektionen mit zwei, drei oder vier Erregern detektiert. Dieses Ergebnis impliziert, dass Infektionen mit mehreren Pathogenen häufig bei Katzen mit Katzenschnupfen vorkommen. Eine Koinfektion mit FHV-1 und FCV wurde bei 18 Katzen nachgewiesen. Ähnlich häufig konnte *C. felis* zusammen mit FCV isoliert werden. Diese Arten von Koinfektionen konnten bereits in einer früheren Studie beobachtet werden (CAI et al., 2002). In anderen Studien wurden bei Katzen mit Katzenschnupfen auch Koinfektionen mit *C. felis* und FHV-1 nachgewiesen (SYKES et al., 2001; HELPS et al., 2003), welche in der vorliegenden Studie nur bei einer kleinen Anzahl von Katzen vorlagen. Betrachtet man das Verhältnis zwischen Monoinfektionen und multiplen Infektionen für die einzelnen hier nachgewiesenen Pathogene, so wird deutlich, dass FHV-1 sowohl als einzelnes Pathogen als auch zusammen mit anderen Erregern ähnlich häufig vorkommt (Verhältnis 28:30). FCV dagegen konnte als Einzelerreger deutlich seltener als in Kombination mit anderen Erregern nachgewiesen werden (10:42). Ebenso wurde *C. felis* vor allem bei Katzen mit multiplen Infektionen nachgewiesen (8:29). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass bei Katzen mit einer nachgewiesenen *C.-felis*- oder FCV-Infektion die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines zweiten Erregers hoch ist und somit weiterführende diagnostische Tests zur Abklärung zusätzlicher Infektionserreger eingeleitet werden sollten.

Bei Katzen, welche sowohl mit FCV als auch *C. felis* infiziert waren, konnten beide Erreger statistisch signifikant häufiger im Rachen im Vergleich zur Konjunktiva nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt sich mit der ebenfalls signifikant höheren Nachweisrate für FCV im Rachen erklären. Für alle weiteren multiplen Infektionen konnte kein Unterschied in der Nachweishäufigkeit zwischen den Lokalisationen festgestellt werden. Besteht anhand der klinischen Symptome ein Verdacht auf eine Infektion mit FCV alleine oder auf eine Koinfektion mit *C. felis*, sollte der Rachen zur Tupferprobenentnahme gewählt werden. Da es aber häufig nicht möglich ist, eine klinische Verdachtsdiagnose für einen bestimmten Erreger zu stellen, sollte eine Lokalisation der Probenentnahme der Rachen sein, um die Wahrscheinlichkeit der Erregerdetektion zu erhöhen.

Des Weiteren wurde untersucht, an wie vielen Lokalisationen die einzelnen Erreger nachweisbar waren. FHV-1 konnte sowohl an einer, an zwei und an drei Lokalisationen bei jeweils annähernd gleich vielen Katzen detektiert werden. Bei 41,4 % der Studienteilnehmer konnte das Pathogen sogar an allen vier Lokalisationen nachgewiesen werden. Wäre der Rachen als alleinige Lokalisation zum Nachweis von FHV-1 gewählt worden, wären 31,1 % der FHV-1-positiven Katzen verpasst worden. Daraus kann geschlossen werden, dass der Rachen alleine nicht die optimale Lokalisation zum Nachweis von FHV-1 darstellt. Hier wäre

eine zusätzliche Tupferprobenentnahme aus der Nase empfehlenswert. Mit Nachweisen aus Rachen und Nase zusammen wären in der vorliegenden Studie 94,9 % der FHV-1-positiven Katzen detektiert worden.

FCV dagegen konnte nur bei 9,6 % der Katzen an einer einzigen Lokalisation nachgewiesen werden. Bei den meisten Katzen konnte der Erreger ähnlich häufig an zwei, drei oder vier Lokalisationen detektiert werden. Bei einer alleinigen Tupferprobenentnahme aus dem Rachen wären 92,3 % der FCV-positiven Katzen detektiert worden. Eine zusätzliche Probenanalyse aus einem Nasentupfer hätte die Anzahl der FCV-positiven Katzen auf 96,1 % angehoben. Somit erscheint der Rachen als alleinige Lokalisation zum Nachweis des FCV geeignet, wenn nur ein Nachweis dieses Erregers angestrebt wird.

C. felis wurde nur bei einer Katze aus zwei und bei drei Katzen aus drei Lokalisationen isoliert. Bei sechs Katzen konnte der Erreger nur aus der Konjunktiva, bei vier Katzen aus der Nase, bei sieben Katzen aus dem Rachen und bei einer Katze nur auf der Zunge detektiert werden. Somit erscheint eine alleinige Probenentnahme von der Konjunktiva im Gegensatz zu bisherigen Empfehlungen aus der Literatur zum Nachweis des Erregers nicht geeignet (MARSILIO et al., 2004; DI MARTINO et al., 2007). Bei einer alleinigen Tupferprobenentnahme aus dem Rachen wären nur 67,6 % der Katzen detektiert worden. Eine Beprobung von Konjunktiva und Rachen oder Nase und Rachen hätte bei 89,2 % und 81,1 % der Katzen einen positiven Erregernachweis erbracht. Somit kann für die Praxis zum Nachweis einer *C.-felis*-Infektion eine Tupferprobenentnahme von Rachen und Konjunktiva oder Rachen und Nase empfohlen werden.

In die vorliegende Studie wurden nur Katzen eingeschlossen, die mindestens ein klinisches Symptom von Katzenschnupfen aufwiesen. Die meisten Katzen zeigten jedoch mehr als ein klinisches Symptom. Dies bestätigt bisherige Kenntnisse, dass die jeweiligen Erreger meist einen Symptomkomplex auslösen und nicht nur ein einziges klinisches Symptom verursachen (POVEY & HALE, 1974; PEDERSEN, 1988; GASKELL et al., 2007). Bei einem Großteil der Katzen konnte seröser oder muköser Nasenausfluss (82,7 %) und Niesen (81,7 %) beobachtet werden. Beide Symptome, zusammengefasst unter dem Begriff „Schnupfen“, konnten bei 58,7 % der Katzen dokumentiert werden. Die Symptome Nasenausfluss und Niesen werden in der Literatur vor allem FHV-1 zugeordnet (BARTHOLOMEW & GILLESPIE, 1968; POVEY, 1979b, 1979a). Schnupfensymptome wurden von anderen Autoren jedoch auch bei FCV-Infektionen beobachtet, hier jedoch weniger stark ausgeprägt (GILLESPIE & SCOTT, 1973). Diese Erkenntnisse stimmen mit den Ergebnissen der

aktuellen Studie überein, in der FHV-1 bei 57,4 % der Katzen mit Schnupfen nachgewiesen wurde, während FCV bei 49,2 % der Katzen mit Schnupfen detektiert wurde. *C. felis* wurde hingegen nur bei 34,4 % der Katzen mit Schnupfen isoliert, sodass sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Nachweishäufigkeit von FHV-1 und *C. felis* für dieses Symptom ergab. Diese Verteilung stimmt mit den Ergebnissen früherer Studien überein (BANNASCH & FOLEY, 2005; BURNS et al., 2011).

Bei der Auswertung der klinischen Symptome von Katzen mit Monoinfektion muss berücksichtigt werden, dass sich das Ergebnis nicht auf die Gesamtheit der Studienteilnehmer mit Schnupfen bezieht, da viele Katzen mit mindestens zwei Pathogenen infiziert waren. Auf der anderen Seite ergibt sich daraus eine bessere Korrelation zwischen einem Pathogen und einem bestimmten klinischem Symptom, da davon ausgegangen werden kann, dass dieses Symptom durch keinen anderen Erreger hervorgerufen wurde. Eine sichere Aussage darüber, welches klinische Symptom durch welchen Erreger bedingt ist, lässt sich aber nur mit Hilfe einer experimentell infizierten Studienpopulation treffen.

Bei sechs Katzen mit Schnupfensymptomen konnte *C. felis* als alleiniger Erreger nachgewiesen werden. Keine dieser Katzen zeigte die für *C. felis* als typisch beschriebene Konjunktivitis (SHEWEN et al., 1980b; RAMSEY, 2000; MASUBUCHI et al., 2002). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass *C. felis* auch respiratorische Symptome verursacht und nicht nur Konjunktividen. Auch in experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass nach einer *C. felis*-Infektion Nasenausfluss und Niesen auftreten können (HOOVER et al., 1978; MASUBUCHI et al., 2002). In einer Studie von MCDONALD und Mitarbeitern (1998) konnte *C. felis* ebenfalls bei drei von 43 Katzen mit respiratorischen Symptomen ohne Konjunktivitis nachgewiesen werden.

Weiterhin wurden die drei Symptome Ulzerationen im Rachen und/oder auf der Zunge, Konjunktivitis und Keratitis/Keratokonjunktivitis näher untersucht, da sie häufig als pathognomonische Veränderungen im Zusammenhang mit bestimmten Erregern angesehen werden. In der vorliegenden Studie konnten bei 15,4 % der Katzen Ulzerationen im Rachen und/oder auf der Zunge festgestellt werden. Bei diesen Katzen wurde FCV häufiger als die beiden anderen Pathogene isoliert. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Nachweishäufigkeit von FCV im Vergleich zu den beiden anderen Erregern ergab sich für das Symptom Ulzerationen in der vorliegenden Studie nicht für Katzen mit einer FCV-Monoinfektion. Dieses Ergebnis ist jedoch wahrscheinlich mit der geringen Anzahl an Katzen mit einer FCV-Monoinfektion (5/104) zu begründen. In anderen Studien konnte ein

Zusammenhang zwischen oralen Ulzerationen und FCV-Infektionen nachgewiesen werden (HOOVER & KAHN, 1975; KNOWLES et al., 1991).

Insgesamt zeigten nur sieben Katzen der Studienpopulation eine Keratitis oder Keratokonjunktivitis. Wie in einer vorangegangenen Studie konnte bei diesen Katzen FHV-1 häufiger als FCV und *C. felis* isoliert werden (DEAN & MEUNIER, 2013), wobei hier jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Dies liegt jedoch wahrscheinlich wiederum in der geringen Anzahl der Katzen mit Keratitis begründet.

Eine Konjunktivitis wurde bei 56 Katzen beobachtet. Bei Katzen mit Monoinfektionen und Konjunktivitis konnte FHV-1 signifikant häufiger detektiert werden als FCV. Auch in anderen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen FHV-1-Infektionen und Konjunktivitis nachgewiesen werden (HELPS et al., 2003; HELPS et al., 2005). Interessanterweise war in der vorliegenden Studie jedoch nicht *C. felis* der prävalenteste Erreger bei Katzen mit Konjunktivitis. Eine mögliche Ursache dafür wäre, dass viele Katzen bereits mit systemischer oder lokaler Antibiotikatherapie vorbehandelt waren und *C. felis* daraufhin nicht mehr nachweisbar war. Zudem ist es möglich, dass *C. felis* zum Zeitpunkt der Tupferprobenentnahme bereits nicht mehr ausgeschieden wurde.

Bei der Beurteilung des Zusammenhangs zwischen Erregernachweis und klinischen Symptomen muss jedoch noch ein weiterer Punkt bedacht werden. Generell kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass manche Katzen einen der drei Erreger zwar ausgeschieden haben, die Ursache ihrer klinischen Symptomatik aber durch eine andere, nicht infektiöse Erkrankung, wie eine Neoplasie oder eine chronische Rhinosinusitis bedingt war. Zudem wurden sowohl akut als auch chronisch kranke Katzen in die Studie aufgenommen. Es ist bekannt, dass chronisch kranke Katzen den jeweiligen Erreger zwar ausscheiden können, dies jedoch häufig nicht mehr konstant und in gleicher Menge geschieht wie bei akut kranken Katzen (THIRY et al., 2009).

Ein weiteres Ziel der Studie war es zu ermitteln, an welchen Lokalisationen die Erreger bei Katzen mit bestimmten, als pathognomonisch geltenden Symptomen, nachzuweisen waren. Beruhend auf Daten aus der Literatur waren die Hypothesen, dass FCV bei Katzen mit Ulzerationen im Rachen an dieser Lokalisation am häufigsten zu detektieren ist (ZICOLA et al., 2009), *C. felis* bei Katzen mit Konjunktivitis auf der Konjunktiva (SJODAHL-ESSEN et al., 2008) und FHV-1 bei Katzen mit Keratitis ebenso konjunktival (BISTNER et al., 1971) am häufigsten nachweisbar wäre. Die Ergebnisse dieser Studie konnten diese Hypothesen nicht bestätigen. Für keinen der Erreger konnte bei Katzen mit Monoinfektionen oder

multiplen Infektionen und bestimmten Symptomen ein Unterschied zwischen den Lokalisationen festgestellt werden. Ein Grund für dieses Ergebnis könnte die relativ kleine Anzahl an Katzen mit pathognomonischen Symptomen sein.

Interessanterweise konnte *C. felis* bei sechs Katzen mit Konjunktivitis und Monoinfektion im Rachen (4/6) und von der Nase (4/6) häufiger isoliert werden als von den Konjunktiven (2/6), wobei auch hier die fehlende Signifikanz wahrscheinlich in der geringen Tierzahl begründet liegt. Es ist jedoch möglich, dass der Zeitpunkt der Tupferprobenentnahme den Nachweis von *C. felis* von den Konjunktiven beeinflusst hat. In einer experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass *C. felis* bei allen 26 infizierten Katzen drei Tage nach Inokulation aus konjunktivalen Tupfern nachweisbar war, während Nasentupfer erst fünf Tage nach Inokulation einen positiven Erregernachweis ergaben (MASUBUCHI et al., 2002). Somit scheint der Zeitpunkt der Tupferprobenentnahme einen Einfluss auf den Nachweis von *C. felis* an der jeweiligen Lokalisation zu haben.

Die PCR hat sich als schnelles, sensitives und kostengünstiges Verfahren zum Nachweis von FHV-1, FCV und *C. felis* etabliert (SYKES et al., 2001). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die PCR im Gegensatz zu anderen diagnostischen Nachweisverfahren wie ELISA oder IFT eine höhere Sensitivität und Spezifität zur Detektion der drei Erreger aufweist (REUBEL et al., 1993; STILES et al., 1997b; BURGESSER et al., 1999; HELPS et al., 2003; RAMPAZZO et al., 2003). Ein Nachteil der PCR ist, dass aufgrund des Nachweises von sowohl lebenden als auch toten Erregern falsch-positive Ergebnisse auftreten können (MAGGS & CLARKE, 2005). Zudem können infizierte Katzen den Erreger permanent oder intermittierend ausscheiden, ohne klinische Symptome einer Infektion aufzuweisen (GASKELL & POVEY, 1977; REUBEL et al., 1993). Andererseits können Symptome wie Nasenausfluss und Niesen auch durch nicht-infektiöse Ursachen wie Neoplasien oder chronische Rhinosinusitis hervorgerufen werden. Außerdem ist es nicht möglich, anhand eines positiven PCR-Ergebnisses zwischen akut und chronisch kranken Katzen zu unterscheiden. Daher muss ein positives PCR-Ergebnis immer im Zusammenhang mit den klinischen Symptomen der Katze beurteilt werden. Da aber alle Katzen, die in die Studie aufgenommen wurden, klinische Symptome von Katzenschnupfen zeigten, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Symptome durch eines der Pathogene verursacht wurden. Zudem können aufgrund des niedrigen Altersdurchschnitts der Studienpopulation nicht-infektiöse Erkrankungen als Ursache für die klinischen Symptome als eher unwahrscheinlich angesehen werden.

Eine Limitation der Studie war die hohe Anzahl an Patienten mit multiplen Infektionen, wodurch ein Zusammenhang zwischen Erregernachweis und klinischen Symptomen nur schwer interpretierbar ist. Zudem muss die geringe Anzahl an Patienten mit pathognomonischen Symptomen wie oralen Ulzerationen und Keratitis als weitere Limitation der Studie angesehen werden. Dies liegt darin begründet, dass bei einer geringen Anzahl der untersuchten Patienten in einer Studienpopulation die statistischen Ergebnisse weniger aussagekräftig sind.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass für den Nachweis von FHV-1, FCV und *C. felis* bei Katzen mit Katzenschnupfen mehrere Lokalisationen zur Probenentnahme gewählt werden sollten, um die Wahrscheinlichkeit, alle Erreger zu detektieren, zu erhöhen. Für alle Erreger empfiehlt sich die Tupferentnahme aus dem Rachen und aus mindestens einer weiteren Lokalisation. Weiterhin konnte kein Zusammenhang zwischen bestimmten pathognomonischen Symptomen und einem Erregernachweis an einer bestimmten Lokalisation hergestellt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine geeignete Lokalisation zur Tupferprobenentnahme für den Nachweis des feline Herpesvirus (FHV-1), feline Calicivirus (FCV) und *Chlamydia felis* (*C. felis*) bei Katzen mit Katzenschnupfen zu bestimmen. Zudem sollte der Zusammenhang zwischen klinischen Symptomen und Erregernachweis an den verschiedenen Lokalisationen untersucht werden.

FCV konnte signifikant häufiger im Rachen und auf der Zunge im Vergleich zur Konjunktiva nachgewiesen werden. Bei einer Koinfektion mit FCV und *C. felis* eignet sich ebenso der Rachen als beste Lokalisation zur Detektion beider Erreger. Für FHV-1 und *C. felis* ergab sich kein Unterschied in der Nachweishäufigkeit zwischen den vier Lokalisationen. Bei der Entnahme nur eines Tupfers sollte somit der Rachen für den Nachweis aller drei Erreger gewählt werden. Durch eine zusätzliche Probenentnahme von der Nase erhöhten sich jedoch die Nachweisraten für *C. felis* um 13,5 %, für FCV um 3,5 % und für FHV-1 um 26,0 %. In der vorliegenden Studie konnten bei der Hälfte der Katzen mit einem positiven Erregernachweis Infektionen mit mehreren Erregern nachgewiesen werden. Bei Katzen mit einer *C. felis*- oder FCV-Infektion waren 78,4 % und 80,8 % der Tiere mit mehr als einem Erreger infiziert. Aus diesem Grund sollten bei Katzen mit Katzenschnupfen immer diagnostische Tests zur Abklärung multipler Infektionserreger eingeleitet werden.

Ein interessantes Ergebnis der Studie ist, dass *C. felis* auch bei Katzen mit respiratorischen Symptomen ohne Konjunktivitis nachgewiesen wurde. Dies widerspricht der gängigen Annahme, dass es sich bei *C. felis* um einen reinen Konjunktivitis-erreger handelt. Die Studie ergab weiterhin, dass anhand typisch pathognomonischer Symptome wie Keratitis, oralen Ulzerationen und Konjunktivitis keine Rückschlüsse sowohl auf die Erregerbeteiligung als auch auf die beste Lokalisation zur Tupferprobenentnahme gezogen werden können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für den Nachweis von FHV-1, FCV und *C. felis* bei Katzen mit Katzenschnupfen möglichst mehrere Lokalisationen zur Probenentnahme gewählt werden sollten, um die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises aller beteiligten Erreger zu erhöhen.

VI. SUMMARY

The objective of this study was to compare four different sampling sites for detection of feline herpesvirus (FHV-1), feline calicivirus (FCV), and *Chlamydia felis* (*C. felis*) in cats with feline upper respiratory tract disease in order to identify a preferred sampling site for each pathogen. Furthermore, the correlation between clinical signs and detection site was investigated for the three pathogens.

FCV was detected significantly more often in the pharynx and on the tongue compared to the other locations. Co-infections with FCV and *C. felis* were also detected more frequently in the pharynx. There was no difference between the four sampling sites for the detection of FHV-1 and *C. felis*. Data suggest that the pharynx should be the preferred sampling site for the detection of FHV-1, FCV, and *C. felis*, if only one sample can be taken. However, obtaining an additional sample from the nose increased the detection rates for *C. felis*, FCV, and FHV-1 to 13.5%, 3.5%, and 26.0%, respectively.

In this study, half of the pathogen-positive cats were infected with multiple pathogens. More than one pathogen was detected in 78.4% of *C. felis*- and in 80.8% of FCV-positive cats. Therefore, it can be recommended to test for multiple pathogens in cats with feline upper respiratory tract disease,.

Surprisingly, *C. felis* was detected as a single pathogen in cats with rhinitis that did not show signs of conjunctivitis, indicating that *C. felis* might be able to cause respiratory signs and not just conjunctivitis. Another result of this study was that, based on pathognomonic signs, such as oral ulceration, keratitis, and conjunctivitis, involvement of pathogens as well as preferred sampling sites for detection of the three pathogens cannot be concluded.

In summary, the results of this study indicate that for the detection of FHV-1, FCV, and *C. felis* in cats with feline upper respiratory tract disease obtaining multiple samples from different locations increases the likelihood for detection of all three pathogens.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abd-Eldaim M, Potgieter L, Kennedy M. Genetic analysis of feline caliciviruses associated with a hemorrhagic-like disease. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 420-9.

Abd-Eldaim MM, Wilkes RP, Thomas KV, Kennedy MA. Development and validation of a TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection of feline calicivirus. *Arch Virol* 2009; 154: 555-60.

Addie DD, Radford A, Yam PS, Taylor DJ. Cessation of feline calicivirus shedding coincident with resolution of chronic gingivostomatitis in a cat. *J Small Anim Pract* 2003; 44: 172-6.

Adler K, Radeloff I, Stephan B, Greife H, Hellmann K. Bacteriological and virological status in upper respiratory tract infections of cats (cat common cold complex). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2007; 120: 120-5.

Amtsberg G, Beer M, Haas L, Verspohl J. Infektionsdiagnostik. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre, 8th edn. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, eds. Stuttgart: Enke 2011: 48-81.

Andrew SE. Ocular manifestations of feline herpesvirus. *J Feline Med Surg* 2001; 3: 9-16.

Baker JA. A Virus Obtained from a Pneumonia of Cats and Its Possible Relation to the Cause of Atypical Pneumonia in Man. *Science* 1942; 96: 475-6.

Baker JA. A Virus Causing Pneumonia in Cats and Producing Elementary Bodies. *J Exp Med* 1944; 79: 159-72.

Bannasch MJ, Foley JE. Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters. *J Feline Med Surg* 2005; 7: 109-19.

Bartholomew PT, Gillespie JH. Feline Viruses I. Characterization of four isolates and their effect on young kitten. *Cornell Vet* 1968; 58: 248-65.

Battilani M, Vaccari F, Carelle MS, Morandi F, Benazzi C, Kipar A, Dondi F, Scagliarini A. Virulent feline calicivirus disease in a shelter in Italy: a case description. *Res Vet Sci* 2013; 95: 283-90.

Bech-Nielsen S, Fulton RW, Cox HU, Hoskins JD, Malone JB, Jr., McGrath RK. Feline respiratory tract disease in Louisiana. *Am J Vet Res* 1980; 41: 1293-8.

Becker Y. The *chlamydia*: molecular biology of procaryotic obligate parasites of eucaryocytes. *Microbiol Rev* 1978; 42: 274-306.

Binns SH, Dawson S, Speakman AJ, Cuevas LE, Hart CA, Gaskell CJ, Morgan KL, Gaskell RM. A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus. *J Feline Med Surg* 2000; 2: 123-33.

Bistner SI, Carlson JH, Shively JN, Scott FW. Ocular manifestations of feline herpesvirus infection. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 159: 1223-37.

Bloom PB. Canine and feline eosinophilic skin diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2006; 36: 141-60.

Burgesser KM, Hotaling S, Schiebel A, Ashbaugh SE, Roberts SM, Collins JK. Comparison of PCR, virus isolation, and indirect fluorescent antibody staining in the detection of naturally occurring feline herpesvirus infections. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 122-6.

Burns RE, Wagner DC, Leutenegger CM, Pesavento PA. Histologic and molecular correlation in shelter cats with acute upper respiratory infection. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2454-60.

Büttner M. Allgemeine Virologie. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre, 8th edn. Mayr A, ed. Stuttgart: Enke 2007: 60-134.

Cai Y, Fukushi H, Koyasu S, Kuroda E, Yamaguchi T, Hirai K. An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan. *J Vet Med Sci* 2002; 64: 215-9.

Carlier Y, Truyens C. Influence of maternal infection on offspring resistance towards parasites. *Parasitol Today* 1995; 11: 94-9.

Carter MJ, Milton ID, Turner PC, Meanger J, Bennett M, Gaskell RM. Identification and sequence determination of the capsid protein gene of feline calicivirus. *Arch Virol* 1992; 122: 223-35.

Cello RM. Clues to differential diagnosis of feline respiratory infections. *J Am Vet Med Assoc* 1971a; 158: 968-73.

Cello RM. Microbiological and immunologic aspects of feline pneumonitis. *J Am Vet Med Assoc* 1971b; 158: Suppl 2:932-8.

Comanducci M, Manetti R, Bini L, Santucci A, Pallini V, Cevenini R, Sueur JM, Orfila J, Ratti G. Humoral immune response to plasmid protein pgp3 in patients with *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun* 1994; 62: 5491-7.

Coutts AJ, Dawson S, Willoughby K, Gaskell RM. Isolation of feline respiratory viruses from clinically healthy cats at UK cat shows. *Vet Rec* 1994; 135: 555-6.

Coyne KP, Jones BR, Kipar A, Chantrey J, Porter CJ, Barber PJ, Dawson S, Gaskell RM, Radford AD. Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats. *Vet Rec* 2006; 158: 544-50.

Crandell RA, Maurer FD. Isolation of a feline virus associated with intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958; 97: 487-90.

Crandell RA, Rehkemper JA, Niemann WH, Ganaway JR, Maurer FD. Experimental feline viral rhinotracheitis. *J Am Vet Med Assoc* 1961; 138: 191-6.

Crandell RA, Fabricant CG, Nelson-Rees WA. Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). In Vitro 1973; 9: 176-85.

Da Silva-Curiel JMA, Nasisse MP, Hook Jr RR, Wilson HH, Collins BK, Mandell CP. Topical fluorescein dye: Effects on immunofluorescent antibody test for feline herpesvirus keratokonjunctivitis. Prog. Vet. Comp. Ophthalmol. 1991; 1: 99-104.

Dawson DA, Gaskell CJ, Radford A. Feline infectious respiratory disease. In: Feline medicine and therapeutics, 3rd edn. A. CE, Gaskell RM, Gaskell CJ, eds. Oxford: Blackwell Science 1994a: 577-95.

Dawson DA, Carman J, Collins J, Hill S, Lappin MR. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of feline herpesvirus 1 IgG in serum, aqueous humor, and cerebrospinal fluid. J Vet Diagn Invest 1998; 10: 315-9.

Dawson S, McArdle F, Bennett D, Carter SD, Bennett M, Ryvar R, Gaskell RM. Investigation of vaccine reactions and breakdowns after feline calicivirus vaccination. Vet Rec 1993; 132: 346-50.

Dawson S, Bennett D, Carter SD, Bennett M, Meanger J, Turner PC, Carter MJ, Milton I, Gaskell RM. Acute arthritis of cats associated with feline calicivirus infection. Res Vet Sci 1994b; 56: 133-43.

Dawson S, Willoughby K, Gaskell RM, Wood G, Chalmers WS. A field trial to assess the effect of vaccination against feline herpesvirus, feline calicivirus and feline panleucopenia virus in 6-week-old kittens. J Feline Med Surg 2001; 3: 17-22.

Dean E, Meunier V. Feline eosinophilic keratoconjunctivitis: a retrospective study of 45 cases (56 eyes). J Feline Med Surg 2013; 15: 661-6.

Dean R, Harley R, Helps C, Caney S, Gruffydd-Jones T. Use of quantitative real-time PCR to monitor the response of *Chlamydomphila felis* infection to doxycycline treatment. J Clin Microbiol 2005; 43: 1858-64.

Di Francesco A, Donati M, Battelli G, Cevenini R, Baldelli R. Seroepidemiological survey for *Chlamydomphila felis* among household and feral cats in northern Italy. Vet Rec 2004; 155: 399-400.

Di Martino B, Di Francesco CE, Meridiani I, Marsilio F. Etiological investigation of multiple respiratory infections in cats. New Microbiol 2007; 30: 455-61.

Dickie CW, Sniff ES. *Chlamydia* infection associated with peritonitis in a cat. J Am Vet Med Assoc 1980; 176: 1256-9.

DiGangi BA, Gray LK, Levy JK, Dubovi EJ, Tucker SJ. Detection of protective antibody titers against feline panleukopenia virus, feline herpesvirus-1, and feline calicivirus in shelter cats using a point-of-care ELISA. J Feline Med Surg 2011; 13: 912-8.

DiGangi BA, Levy JK, Griffin B, McGorray SP, Dubovi EJ, Dingman PA, Tucker SJ. Prevalence of serum antibody titers against feline panleukopenia virus, feline herpesvirus 1, and feline calicivirus in cats entering a Florida animal shelter. J Am Vet Med Assoc 2012; 241: 1320-5.

Dinnage JD, Scarlett JM, Richards JR. Descriptive epidemiology of feline upper respiratory tract disease in an animal shelter. J Feline Med Surg 2009; 11: 816-25.

Donati M, Laroucau K, Storni E, Mazzeo C, Magnino S, Di Francesco A, Baldelli R, Ceglie L, Renzi M, Cevenini R. Serological response to pgp3 protein in animal and human chlamydial infections. Vet Microbiol 2009; 135: 181-5.

Dovc A, Vlahovic K, Suhadolc - Scholten S, Tozon N. Presence of IgG antibodies against *Chlamydomphila felis* in cats positive to FIV and/or FeLV. Acta Vet-Beograd 2008; 58: 17-23.

Ellis TM. Jaundice in a Siamese cat with in utero feline calicivirus infection. Aust Vet J 1981; 57: 383-5.

Everett KD. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. Vet Microbiol 2000; 75:

109-26.

Fastier LB. A new feline virus isolated in tissue culture. Am J Vet Res 1957; 18: 382-9.

Flagstad A. Experimental picornavirus infection in cats. Acta Vet Scand 1973; 14: 501-10.

Ford R. Viral upper respiratory infection in cats. Compend Contin Educ Prac Vet 1991; 13: 593-601.

Ford R. Feline viral upper respiratory infection. Compend Contin Educ Prac Vet 1997; 19: 16-20.

Fukushi H, Ogawa H, Minamoto N, Hashimoto A, Yagami K, Tamura H, Shimakura S, Hirai K. Seroepidemiological surveillance of *Chlamydia psittaci* in cats and dogs in Japan. Vet Rec 1985; 117: 503-4.

Gaillard ET, Hargis AM, Prieur DJ, Evermann JF, Dhillon AS. Pathogenesis of feline gastric chlamydial infection. Am J Vet Res 1984; 45: 2314-21.

Gaskell R, Dawson S, Radford A, Thiry E. Feline herpesvirus. Vet Res 2007; 38: 337-54.

Gaskell RM, Povey RC. Experimental induction of feline viral rhinotracheitis virus re-excretion in FVR-recovered cats. Vet Rec 1977; 100: 128-33.

Gaskell RM, Povey RC. The dose response of cats to experimental infection with feline viral rhinotracheitis virus. J Comp Pathol 1979; 89: 179-91.

Gaskell RM, Povey RC. Transmission of feline viral rhinotracheitis. Vet Rec 1982; 111: 359-62.

Gaskell RM, Dennis PE, Goddard LE, Cocker FM, Wills JM. Isolation of felid herpesvirus I from the trigeminal ganglia of latently infected cats. J Gen Virol 1985; 66 391-4.

Gaskell RM. Upper respiratory disease in the cat (including *chlamydia*): control and prevention. Feline Pract 1993; 21: 29-34.

Gaskell RM, Dawson S, Radford A. Other feline viral diseases. In: Textbook of veterinary internal medicine, 7th edn. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. St. Louis: Saunders 2011: 946-8.

Gaskell RM, Dawson S, Radford A. Feline Respiratory Disease. In: Infectious Diseases of the dog and the cat, 4th edn. Greene C, ed. Missouri: Elsevier Saunders 2012: 151-62.

Gaston JZ, Stengel C, Harbour D, Krieger S, Stampf S, Hartmann K. Prävalenz des feline Herpesvirus-1, feline Calicivirus und von *Chlamydomydia felis* in Mehrkatzenhaushalten. Kleintierpraxis 2004; 33: 351-8.

Geissler K, Schneider K, Platzer G, Truyen B, Kaaden OR, Truyen U. Genetic and antigenic heterogeneity among feline calicivirus isolates from distinct disease manifestations. Virus Res 1997; 48: 193-206.

Gerhardt N, Schulz BS, Werckenthin C, Hartmann K. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its efficacy in comparison with doxycycline in the treatment of *Chlamydomydia felis* infection in cats with conjunctivitis. Vet Rec 2006; 159: 591-4.

Gethings PM, Stephens GL, Wills JM, Howard P, Balfour AH, Wright AI, Morgan KL. Prevalence of *chlamydia*, *toxoplasma*, *toxocara* and ringworm in farm cats in south-west England. Vet Rec 1987; 121: 213-6.

Gijsen AP, Land JA, Goossens VJ, Slobbe ME, Bruggeman CA. *Chlamydia* antibody testing in screening for tubal factor subfertility: the significance of IgG antibody decline over time. Hum Reprod 2002; 17: 699-703.

Gillespie GY, Judkins AB, Scott FW. Feline Viruses II. Hemagglutination and Hemadsorption Tests for feline Herpesvirus. Cornell Vet 1970; 61: 159-71.

Gillespie JH, Judkins AB, Kahn DE. Feline viruses. XIII. The use of the immunofluorescent

test for the detection of feline picornaviruses. Cornell Vet 1971; 61: 172-9.

Gillespie JH, Scott FW. Feline viral infections. Adv Vet Sci Comp Med 1973; 17: 163-200.

Gordana GG, Ksenija V, Brigita S, Gracner D, Docvc A. PCR confirmation of *Chlamydophila felis* from nasal and conjunctival swab samples of a domestic cat in Croatia. Acta Vet-Beograd 2010; 60: 23-9.

Gould D. Feline herpesvirus-1: ocular manifestations, diagnosis and treatment options. J Feline Med Surg 2011; 13: 333-46.

Gruffydd-Jones T, Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. *Chlamydophila felis* infection. ABCD guidelines on prevention and management. J Feline Med Surg 2009; 11: 605-9.

Gruffydd-Jones TJ, Jones BR, Hodge H, Rice M, Gething MA. *Chlamydia* infection in cats in New Zealand. New Zeal Vet J 1995; 43: 201-3.

Halanova M, Sulinova Z, Cislakova L, Trbolova A, Palenik L, Weisssova T, Halan M, Kalinova Z, Holickova M. *Chlamydophila felis* in cats-are the stray cats dangerous source of infection? Zoonoses Public Hlth 2011; 58: 519-22.

Hamano M, Maeda K, Mizukoshi F, Une Y, Mochizuki M, Tohya Y, Akashi H, Kai K. Experimental infection of recent field isolates of feline herpesvirus type 1. J Vet Med Sci 2003; 65: 939-43.

Hara M, Fukuyama M, Suzuki Y, Kisikawa S, Ikeda T, Kiuchi A, Tabuchi K. Detection of feline herpesvirus 1 DNA by the nested polymerase chain reaction. Vet Microbiol 1996; 48: 345-52.

Harbour DA, Howard PE, Gaskell RM. Isolation of feline calicivirus and feline herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989. Vet Rec 1991; 128: 77-80.

Hargis AM, Prieur DJ, Gaillard ET. Chlamydial infection of the gastric mucosa in twelve cats. *Vet Pathol* 1983; 20: 170-8.

Hargis AM, Ginn PE. Feline herpesvirus 1-associated facial and nasal dermatitis and stomatitis in domestic cats. *Vet Clin N Am-Small* 1999; 29: 1281-90.

Harley R, Catanese B, Helps C. Polymorphic membrane proteins 1 and 7 from *Chlamydophila felis* are significant immunodominant proteins. *Vet Microbiol* 2010; 144: 415-21.

Hartmann AD, Hawley J, Werckenthin C, Lappin MR, Hartmann K. Detection of bacterial and viral organisms from the conjunctiva of cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease. *J Feline Med Surg* 2010; 12: 775-82.

Hartmann K, Kuffer M. Karnofsky's score modified for cats. *Eur J Med Res* 1998; 3: 95-8.

Hartmann K. Katzenschnupfen - Erreger, Pathogenese, Diagnostik und Therapie. *Kleintierpraxis* 2009; 54: 448-61.

Helps C, Reeves N, Tasker S, Harbour D. Use of real-time quantitative PCR to detect *Chlamydophila felis* infection. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2675-6.

Helps C, Lait P, Tasker S, Harbour D. Melting curve analysis of feline calicivirus isolates detected by real-time reverse transcription PCR. *J Virol Methods* 2002; 106: 241-4.

Helps C, Harbour D. Detection of nucleotide polymorphisms in feline calicivirus isolates by reverse transcription PCR and a fluorescence resonance energy transfer probe. *J Virol Methods* 2003; 109: 261-3.

Helps C, Reeves N, Egan K, Howard P, Harbour D. Detection of *Chlamydophila felis* and feline herpesvirus by multiplex real-time PCR analysis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2734-6.

Helps CR, Lait P, Damhuis A, Bjornehammar U, Bolta D, Brovida C, Chabanne L, Egberink

H, Ferrand G, Fontbonne A, Pennisi MG, Gruffydd-Jones T, Gunn-Moore D, Hartmann K, Lutz H, Malandain E, Mostl K, Stengel C, Harbour DA, Graat EA. Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydophila felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: experience from 218 European catteries. Vet Rec 2005; 156: 669-73.

Hohdatsu T, Sato K, Tajima T, Koyama H. Neutralizing feature of commercially available feline calicivirus (FCV) vaccine immune sera against FCV field isolates. J Vet Med Sci 1999; 61: 299-301.

Holland JL, Outerbridge CA, Affolter VK, Maggs DJ. Detection of feline herpesvirus 1 DNA in skin biopsy specimens from cats with or without dermatitis. J Am Vet Med Assoc 2006; 229: 1442-6.

Holst BS, Berndtsson LT, Englund L. Isolation of feline herpesvirus-1 and feline calicivirus from healthy cats in Swedish breeding catteries. J Feline Med Surg 2005; 7: 325-31.

Holst BS, Englund L, Palacios S, Renstrom L, Berndtsson LT. Prevalence of antibodies against feline coronavirus and *Chlamydophila felis* in Swedish cats. J Feline Med Surg 2006; 8: 207-11.

Holst BS, Hanas S, Berndtsson LT, Hansson I, Soderlund R, Aspan A, Sjodahl-Essen T, Bolske G, Greko C. Infectious causes for feline upper respiratory tract disease- a case-control study. J Feline Med Surg 2010; 12: 783-9.

Hoover EA, Kahn DE. Experimentally induced feline calicivirus infection: clinical signs and lesions. J Am Vet Med Assoc 1975; 166: 463-8.

Hoover EA, Kahn DE, Langloss JM. Experimentally induced feline chlamydial infection (feline pneumonitis). Am J Vet Res 1978; 39: 541-7.

Hurley KE, Pesavento PA, Pedersen NC, Poland AM, Wilson E, Foley JE. An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. J Am Vet Med Assoc 2004; 224: 241-9.

Hussein IT, Field HJ. Development of a quantitative real-time TaqMan PCR assay for testing the susceptibility of feline herpesvirus-1 to antiviral compounds. *J Virol Methods* 2008; 152: 85-90.

Jensen MM, Buell DJ, McKim RM. Isolation rates of feline respiratory viruses in local cat populations. *J Small Anim Pract* 1977; 18: 659-61.

Johnson LR, Foley JE, De Cock HE, Clarke HE, Maggs DJ. Assessment of infectious organisms associated with chronic rhinosinusitis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 227: 579-85.

Johnson RP, Povey RC. Transfer and decline of maternal antibody to feline calicivirus. *Can Vet J* 1983; 24: 6-9.

Kahn DE, Gillespie JH. Feline viruses: pathogenesis of picornavirus infection in the cat. *Am J Vet Res* 1971; 32: 521-31.

Kahn DE, Hoover EA, Bittle JL. Induction of immunity to feline caliciviral disease. *Infect Immun* 1975; 11: 1003-9.

Knowles JO, Gaskell RM, Gaskell CJ, Harvey CE, Lutz H. Prevalence of feline calicivirus, feline leukaemia virus and antibodies to FIV in cats with chronic stomatitis. *Vet Rec* 1989; 124: 336-8.

Knowles JO, McArdle F, Dawson S, Carter SD, Gaskell CJ, Gaskell RM. Studies on the role of feline calicivirus in chronic stomatitis in cats. *Vet Microbiol* 1991; 27: 205-19.

Krüger M, Seidler T. Allgemeine Bakteriologie. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 8th edn. Mayr A, ed. Stuttgart: Enke 2007: 344-92.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95-125.

Lappin MR, Andrews J, Simpson D, Jensen WA. Use of serologic tests to predict resistance to feline herpesvirus 1, feline calicivirus, and feline parvovirus infection in cats. J Am Vet Med Assoc 2002; 220: 38-42.

Lau RC, Halliday AJ, Davies H. Evaluation of the immunogenicity of attenuated feline calicivirus vaccines by ELISA. Vet Microbiol 1992; 31: 139-46.

Lauritzen A, Jarrett O, Sabara M. Serological analysis of feline calicivirus isolates from the United States and United Kingdom. Vet Microbiol 1997; 56: 55-63.

Lazarowicz M. A serological survey in cats for antibodies to respiratory viruses and *chlamydia*. Z Versuchstierkd 1977; 19: 325.

Lazarowicz M, Steck F, Kihm U, Moehl H. Respiratory infections of the cat. A serological survey in different populations. Zbl Vet Med B 1982; 29: 769-75.

Lindt S, Mühlethaler E, Bürki F. Enzoootic virus-induced cat flu at an animal shelter: Clinical features, histopathology, aetiology and epizootiology Schweizer Arch Tierh 1965; 107: 91-101.

Longbottom D, Livingstone M. Vaccination against chlamydial infections of man and animals. Vet J 2006; 171: 263-75.

Love DN. Pathogenicity of a strain of feline calicivirus for domestic kittens. Aust Vet J 1975; 51: 541-6.

Low HC, Powell CC, Veir JK, Hawley JR, Lappin MR. Prevalence of feline herpesvirus 1, *Chlamydomphila felis*, and *Mycoplasma* spp DNA in conjunctival cells collected from cats with and without conjunctivitis. Am J Vet Res 2007; 68: 643-8.

Lyon KF. Gingivostomatitis. Vet Clin N Am-Small 2005; 35: 891-911, vii.

Maeda K, Horimoto T, Mikami T. Properties and functions of feline herpesvirus type 1

glycoproteins. J Vet Med Sci 1998; 60: 881-8.

Maggs DJ, Lappin MR, Reif JS, Collins JK, Carman J, Dawson DA, Bruns C. Evaluation of serologic and viral detection methods for diagnosing feline herpesvirus-1 infection in cats with acute respiratory tract or chronic ocular disease. J Am Vet Med Assoc 1999; 214: 502-7.

Maggs DJ. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of feline herpesvirus type 1. Clin Tech Small Anim Pract 2005a; 20: 94-101.

Maggs DJ. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of feline herpesvirus type 1. Clin Tech Small An P 2005b; 20: 94-101.

Maggs DJ, Clarke HE. Relative sensitivity of polymerase chain reaction assays used for detection of feline herpesvirus type 1 DNA in clinical samples and commercial vaccines. Am J Vet Res 2005; 66: 1550-5.

Marsilio F, Di Martino B, Di Francesco C. Use of a duplex-PCR assay to screen for Feline Herpesvirus-1 and *Chlamydophila* spp. in mucosal swabs from cats. New Microbiol 2004; 27: 287-92.

Marsilio F, Di Martino B, Decaro N, Buonavoglia C. A novel nested PCR for the diagnosis of calicivirus infections in the cat. Vet Microbiol 2005; 105: 1-7.

Masubuchi K, Nosaka H, Iwamoto K, Kokubu T, Yamanaka M, Shimizu Y. Experimental infection of cats with *Chlamydophila felis*. J Vet Med Sci 2002; 64: 1165-8.

McCabe VJ, Tarpey I, Spibey N. Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein. Vaccine 2002; 20: 2454-62.

McDonald M, Willett BJ, Jarrett O, Addie DD. A comparison of DNA amplification, isolation and serology for the detection of *Chlamydia psittaci* infection in cats. Vet Rec 1998; 143: 97-101.

McKercher DG. Feline pneumonitis. I. Immunization studies in kittens. Am J Vet Res 1952; 13: 557-61.

Millan J, Rodriguez A. A serological survey of common feline pathogens in free-living European wildcats (*Felis silvestris*) in central Spain. Eur J Wildlife Res 2009; 55: 285.

Mitzel JR, Strating A. Vaccination against feline pneumonitis. Am J Vet Res 1977; 38: 1361-3.

Mochizuki M, Kawakami K, Hashimoto M, Ishida T. Recent epidemiological status of feline upper respiratory infections in Japan. J Vet Med Sci 2000; 62: 801-3.

Mouzin DE, Lorenzen MJ, Haworth JD, King VL. Duration of serologic response to three viral antigens in cats. J Am Vet Med Assoc 2004; 224: 61-6.

Nasisse MP, Guy JS, Davidson MG, Sussman WA, Fairley NM. Experimental ocular herpesvirus infection in the cat. Sites of virus replication, clinical features and effects of corticosteroid administration. Invest Ophth Vis Sci 1989; 30: 1758-68.

Nasisse MP. Feline herpesvirus ocular disease. Vet Clin North A-Small 1990; 20: 667-80.

Nasisse MP, Guy JS, Stevens JB, English RV, Davidson MG. Clinical and laboratory findings in chronic conjunctivitis in cats: 91 cases (1983-1991). J Am Vet Med Assoc 1993; 203: 834-7.

Nasisse MP, Weigler BJ. The diagnosis of ocular feline herpesvirus infection. Vet Comp Ophthalmol 1997; 44-51.

Nasisse MP, Glover TL, Moore CP, Weigler BJ. Detection of feline herpesvirus 1 DNA in corneas of cats with eosinophilic keratitis or corneal sequestration. Am J Vet Res 1998; 59: 856-8.

O'Brien WJ, Taylor JL. The isolation of herpes simplex virus from rabbit corneas during

latency. Invest Ophth Vis Sci 1989; 30: 357-64.

O'Dair HA, Hopper CD, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA, Waters L. Clinical aspects of *Chlamydia psittaci* infection in cats infected with feline immunodeficiency virus. Vet Rec 1994; 134: 365-8.

Ohya K, Takahara Y, Kuroda E, Koyasu S, Hagiwara S, Sakamoto M, Hisaka M, Morizane K, Ishiguro S, Yamaguchi T, Fukushi H. *Chlamydophila felis* CF0218 is a novel TMH family protein with potential as a diagnostic antigen for diagnosis of *C. felis* infection. Clin Vaccine Immunol 2008; 15: 1606-15.

Ohya K, Okuda H, Maeda S, Yamaguchi T, Fukushi H. Using CF0218-ELISA to distinguish *Chlamydophila felis*-infected cats from vaccinated and uninfected domestic cats. Vet Microbiol 2010; 146: 366-70.

Ormerod E, McCandlish IA, Jarrett O. Diseases produced by feline caliciviruses when administered to cats by aerosol or intranasal instillation. Vet Rec 1979; 104: 65-9.

Parija SC. Immune Response. In: Textbook of Microbiology & Immunology. Parija SC, ed. India: Elsevier 2009: 139-48.

Pedersen NC, Labierte L, Ekman S. A transient febrile limping syndrome of kittens caused by two different strains of feline calicivirus. Feline Pract 1983; 13: 26-34.

Pedersen NC. *Chlamydiosis*. In: Feline infectious diseases. Publications AV, ed. Goleta CA: 1988: 231-6.

Pedersen NC, Hawkins KF. Mechanisms for persistence of acute and chronic feline calicivirus infections in the face of vaccination. Vet Microbiol 1995; 47: 141-56.

Pedersen NC, Elliott JB, Glasgow A, Poland A, Keel K. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. Vet Microbiol 2000; 73: 281-300.

Pettersson B, Andersson A, Leitner T, Olsvik O, Uhlen M, Storey C, Black CM. Evolutionary relationships among members of the genus *Chlamydia* based on 16S ribosomal DNA analysis. J Bacteriol 1997; 179: 4195-205.

Planz O, Seiler P, Hengartner H, Zinkernagel RM. Specific cytotoxic T cells eliminate B cells producing virus-neutralizing antibodies Nature 1996; 382: 726-9.

Pointon AM. *Chlamydia* infection among breeding catteries in south australia Aust Vet J 1994; 21: 58-63.

Poulet H, Brunet S, Leroy V, Chappuis G. Immunisation with a combination of two complementary feline calicivirus strains induces a broad cross-protection against heterologous challenges. Vet Microbiol 2005; 106: 17-31.

Povey C, Ingersoll J. Cross-protection among feline caliciviruses. Infect Immun 1975; 11: 877-85.

Povey RC, Johnson RH. A standardized serum neutralization test for feline viral rhinotracheitis. I. Virus assay. J Comp Pathol 1969a; 79: 379-85.

Povey RC, Johnson RH. A standardized serum neutralization test for feline viral rhinotracheitis. II. The virus-serum system. J Comp Pathol 1969b; 79: 387-92.

Povey RC, Johnson RH. A survey of feline viral rhinotracheitis and feline picornavirus infection in Britain. J Small Anim Pract 1971; 12: 233-47.

Povey RC, Hale CJ. Experimental infections with feline caliciviruses (picornaviruses) in specific-pathogen-free kittens. J Comp Pathol 1974; 84: 245-56.

Povey RC. Serological relationships among feline caliciviruses. Infect Immun 1974; 10: 1307-14.

Povey RC. A review of feline viral rhinotracheitis (feline herpesvirus I infection). Comp

Immunol Microb 1979a; 2: 373-87.

Povey RC. A review of feline viral rhinotracheitis (feline herpesvirus I infection). Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1979b; 2: 373-87.

Pudjiatmoko, Fukushi H, Ochiai Y, Yamaguchi T, Hirai K. Phylogenetic analysis of the genus *Chlamydia* based on 16S rRNA gene sequences. Int J Syst Bacteriol 1997; 47: 425-31.

Quimby JM, Elston T, Hawley J, Brewer M, Miller A, Lappin MR. Evaluation of the association of Bartonella species, feline herpesvirus 1, feline calicivirus, feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus with chronic feline gingivostomatitis. J Feline Med Surg 2008; 10: 66-72.

Radford A, Gaskell RM, Dawson S. Feline Viral Upper Respiratory Disease. In: Textbook of Respiratory disease in dogs and cats. King LG, ed.: 2004:271-83.

Radford AD, Dawson S, Coyne KP, Porter CJ, Gaskell RM. The challenge for the next generation of feline calicivirus vaccines. Vet Microbiol 2006; 117: 14-8.

Radford AD, Coyne KP, Dawson S, Porter CJ, Gaskell RM. Feline calicivirus. Vet Res 2007; 38: 319-35.

Radford AD, Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. Feline calicivirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. J Feline Med Surg 2009; 11: 556-64.

Rampazzo A, Appino S, Pregel P, Tarducci A, Zini E, Biolatti B. Prevalence of *Chlamydophila felis* and feline herpesvirus 1 in cats with conjunctivitis in northern Italy. J Vet Intern Med 2003; 17: 799-807.

Ramsey DT. Feline *chlamydia* and calicivirus infections. Vet Clin N Am-Small 2000; 30: 1015-28.

Rand J. Akutes Auftreten von Niesen und Nasenausfluss. In: Praxishandbuch - Katzenkrankheiten. Rand J, ed. München: Urban und Fischer 2006: 9-20.

Ratcliff RM, Doherty JC, Higgins GD. Sensitive detection of RNA viruses associated with gastroenteritis by a hanging-drop single-tube nested reverse transcription-PCR method. J Clin Microbiol 2002; 40: 4091-9.

Reinard T. Polymerase Kettenreaktion. In: Molekularbiologische Methoden. Reinard T, ed. Stuttgart: Eugen Ulmer KG 2010a: 81-101.

Reinard T. Immunbiochemische Methoden. In: Molekularbiologische Methoden. Reinard T, ed. Stuttgart: Eugen Ulmer KG 2010b: 219-40.

Reinard T. Gelelektrophorese von Proteinen. In: Molekularbiologische Methoden. Reinard T, ed. Stuttgart: Eugen Ulmer KG 2010c: 197-214.

Reubel GH, Hoffmann DE, Pedersen NC. Acute and chronic faucitis of domestic cats. A feline calicivirus-induced disease. Vet Clin N Am-Small 1992; 22: 1347-60.

Reubel GH, Ramos RA, Hickman MA, Rimstad E, Hoffmann DE, Pedersen NC. Detection of active and latent feline herpesvirus 1 infections using the polymerase chain reaction. Arch Virol 1993; 132: 409-20.

Reynolds BS, Poulet H, Pingret JL, Jas D, Brunet S, Lemeter C, Etievant M, Boucraut-Baralon C. A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France. J Feline Med Surg 2009; 11: 633-44.

Rice CC, Kruger JM, Venta PJ, Vilnis A, Maas KA, Dulin JA, Maes RK. Genetic characterization of 2 novel feline caliciviruses isolated from cats with idiopathic lower urinary tract disease. J Vet Intern Med 2002; 16: 293-302.

Rich LJ, Fabricant CG. Experimental production of urolithiasis in male cats. J Am Vet Med Assoc 1971; 158: Suppl 2:974-6.

Richmond SJ. The isolation of *Chlamydia* subgroup A (*Chlamydia trachomatis*) in irradiated McCoy cells. Med Lab Technol 1974; 31: 7-9.

Roberts SR, Dawson CR, Coleman V, Togni B. Dendritic keratitis in a cat. J Am Vet Med Assoc 1972; 161: 285-9.

Ruch-Gallie RA, Veir JK, Hawley JR, Lappin MR. Results of molecular diagnostic assays targeting feline herpesvirus-1 and feline calicivirus in adult cats administered modified live vaccines. J Feline Med Surg 2011; 13: 541-5.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487-91.

Sanderson TP, Andersen AA. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of *Chlamydia psittaci* in vaginal secretions, placentas, and fetal tissues from aborting ewes. J Vet Diagn Invest 1989; 1: 309-15.

Sandmeyer LS, Waldner CL, Bauer BS, Wen X, Bienzle D. Comparison of polymerase chain reaction tests for diagnosis of feline herpesvirus, *Chlamydophila felis*, and *Mycoplasma* spp. infection in cats with ocular disease in Canada. Can Vet J 2010; 51: 629-33.

Satoh Y, Iizuka K, Fukuyama M, Kishikawa S, Nishino Y, Ikeda T, Kiuchi A, Hara M, Tabuchi K. An enzyme-linked immunosorbent assay using nuclear antigen for detection of feline herpesvirus 1 antibody. J Vet Diagn Invest 1999; 11: 334-40.

Schmeer N, Ahrens M, Krauss H, Schiefer H, Weidner W. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern bei Chlamydien-Infektionen des Menschen. Zentralbl Bakteriol P 1983; 256: 119-31.

Schorr-Evans EM, Poland A, Johnson WE, Pedersen NC. An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England. J Feline Med Surg 2003; 5: 217-26.

Schulz BS, Hartmann K, Unterer S, Eichhorn W, Majzoub M, Homeier-Bachmann T, Truyen U, Ellenberger C, Huebner J. Two outbreaks of virulent systemic feline calicivirus infection in cats in Germany. *Berl Munch Tierarztl* 2011; 124: 186-93.

Schwantes A, Truyen U, Weikel J, Weiss C, Lochelt M. Application of chimeric feline foamy virus-based retroviral vectors for the induction of antiviral immunity in cats. *J Virol* 2003; 77: 7830-42.

Scott FW, Geissinger CM. Long-term immunity in cats vaccinated with an inactivated trivalent vaccine. *Am J Vet Res* 1999; 60: 652-8.

Selbitz H-J. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7th edn. Mayr A, Rolle M, eds. Stuttgart: Enke 2002: 417-588.

Sellon RK. Update on molecular techniques for diagnostic testing of infectious disease. *Vet Clin N Am-Small* 2003; 33: 677-93.

Shewen PE, Povey RC, Wilson MR. Case report. Feline chlamydial infection. *Can Vet J* 1978; 19: 289-92.

Shewen PE, Povey RC, Wilson MR. A comparison of the efficacy of a live and four inactivated vaccine preparations for the protection of cats against experimental challenge with *Chlamydia psittaci*. *Can J Comp Med* 1980a; 44: 244-51.

Shewen PE, Povey RC, Wilson MR. A survey of the conjunctival flora of clinically normal cats and cats with conjunctivitis. *Can Vet J* 1980b; 21: 231-3.

Sibitz C, Rudnay EC, Wabnegger L, Spargser J, Apfalter P, Nell B. Detection of *Chlamydomonas pneumoniae* in cats with conjunctivitis. *Vet Ophthalmol* 2011; 14 67-74.

Sjodahl-Essen T, Tidholm A, Thoren P, Persson-Wadman A, Bolske G, Aspan A, Berndtsson LT. Evaluation of different sampling methods and results of real-time PCR for detection of feline herpes virus-1, *Chlamydomonas felis* and *Mycoplasma felis* in cats. *Vet Ophthalmol*

2008; 11: 375-80.

Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. J Virol 2002; 76: 7060-72.

Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, Onwudiwe O, Green KY. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. J Virol 2005; 79: 4012-24.

Stiles J. Treatment of cats with ocular disease attributable to herpesvirus infection: 17 cases (1983-1993). J Am Vet Med Assoc 1995; 207: 599-603.

Stiles J, McDermott M, Bigsby D, Willis M, Martin C, Roberts W, Greene C. Use of nested polymerase chain reaction to identify feline herpesvirus in ocular tissue from clinically normal cats and cats with corneal sequestra or conjunctivitis. Am J Vet Res 1997a; 58: 338-42.

Stiles J, McDermott M, Willis M, Roberts W, Greene C. Comparison of nested polymerase chain reaction, virus isolation, and fluorescent antibody testing for identifying feline herpesvirus in cats with conjunctivitis. Am J Vet Res 1997b; 58: 804-7.

Stiles J. Feline herpesvirus. Vet Clin N Am-Small 2000; 30: 1001-14.

Stiles J. Feline herpesvirus. Clin Tech Small An P 2003; 18: 178-85.

Stroop WG, Baringer JR. Persistent, slow and latent viral infections. Prog Med Virol 1982; 28: 1-43.

Studdert MJ, Martin MC. Virus diseases of the respiratory tract of cats. 1. Isolation of feline rhinotracheitis virus. Aust Vet J 1970; 46: 99-104.

Studdert MJ, Studdert VP, Wirth HJ. Isolation of *Chlamydia psittaci* from cats with conjunctivitis. Aust Vet J 1981; 57: 515-7.

Sussman MD, Maes RK, Kruger JM. Vaccination of cats for feline rhinotracheitis results in a quantitative reduction of virulent feline herpesvirus-1 latency load after challenge. *Virology* 1997; 228: 379-82.

Sykes JE, Studdert VP, Anderson G, Browning GF. Comparison of *Chlamydia psittaci* from cats with upper respiratory tract disease by polymerase chain reaction analysis of the ompA gene. *Vet Rec* 1997a; 140: 310-3.

Sykes JE, Browning GF, Anderson G, Studdert VP, Smith HV. Differential sensitivity of culture and the polymerase chain reaction for detection of feline herpesvirus 1 in vaccinated and unvaccinated cats. *Arch Virol* 1997b; 142: 65-74.

Sykes JE, Studdert VP, Browning GF. Detection and strain differentiation of feline calicivirus in conjunctival swabs by RT-PCR of the hypervariable region of the capsid protein gene. *Arch Virol* 1998; 143: 1321-34.

Sykes JE, Anderson GA, Studdert VP, Browning GF. Prevalence of feline *Chlamydia psittaci* and feline herpesvirus 1 in cats with upper respiratory tract disease. *J Vet Intern Med* 1999a; 13: 153-62.

Sykes JE, Studdert VP, Browning GF. Comparison of the polymerase chain reaction and culture for the detection of feline *Chlamydia psittaci* in untreated and doxycycline-treated experimentally infected cats. *J Vet Intern Med* 1999b; 13: 146-52.

Sykes JE. Feline Upper Respiratory Tract Pathogens: Herpesvirus-1 and Calicivirus. *Comp Cont Educ Pract* 2001; 23: 166-77.

Sykes JE, Allen JL, Studdert VP, Browning GF. Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and *Chlamydia psittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. *Vet Microbiol* 2001; 81: 95-108.

Sykes JE, Greene C. Chlamydial Infections. In: *Infectious diseases of the dog and cat*, 4th edn. Greene C, ed. Missouri: Elsevier Saunders 2012: 270-6.

Sykes JE. Feline respiratory viral infections. In: Canine and feline infectious diseases. Sykes JE, ed. Missouri: Elsevier Saunders 2014a: 239-51.

Sykes JE. Chlamydial Infections. In: Canine and feline infectious diseases, 1st edn. Sykes JE, ed. Missouri: Elsevier Saunders 2014b: 226-33.

Tajima T, Takeda Y, Tohya Y, Sugii S. Reactivities of feline calicivirus field isolates with monoclonal antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay. J Vet Med Sci 1998a; 60: 753-5.

Tajima T, Yoshizaki S, Nakata E, Tohya Y, Ishiguro S, Fujikawa Y, Sugii S. Production of a monoclonal antibody reacted broadly with feline calicivirus field isolates. J Vet Med Sci 1998b; 60: 155-60.

TerWee J, Sabara M, Kokjohn K, Sandbulte J, Frenchick P, Dreier KJ. Characterization of the systemic disease and ocular signs induced by experimental infection with *Chlamydia psittaci* in cats. Vet Microbiol 1998; 59: 259-81.

Tham KM, Studdert MJ. Antibody and cell-mediated immune responses to feline calicivirus following inactivated vaccine and challenge. Zbl Vet Med B 1987; 34: 640-54.

Thiele D, Karo M, Krauss H. Monoclonal antibody based capture ELISA/ELIFA for the detection of *chlamydia psittaci* in veterinary clinical specimens. Zbl Bakt S 1992; 277: 39-48.

Thiry E, Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Truyen U, Horzinek MC. Feline herpesvirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. J Feline Med Surg 2009; 11: 547-55.

Thompson RR, Wilcox GE, Clark WT, Jansen KL. Association of calicivirus infection with chronic gingivitis and pharyngitis in cats. J Small Anim Pract 1984; 25: 207-10.

Townsend WM, Stiles J, Guptill-Yoran L, Krohne SG. Development of a reverse

transcriptase-polymerase chain reaction assay to detect feline herpesvirus-1 latency-associated transcripts in the trigeminal ganglia and corneas of cats that did not have clinical signs of ocular disease. Am J Vet Res 2004; 65: 314-9.

Travnicek M, Mardzinova S, Cislakova L, Valocky I, Weissova T. Chlamydial infection of cats and human health. Folia Microbiol 2002; 47: 441-4.

Van Vuuren M, Geissler K, Gerber D, Nothling JO, Truyen U. Characterisation of a potentially abortigenic strain of feline calicivirus isolated from a domestic cat. Vet Rec 1999; 144: 636-8.

Veir JK, Ruch-Gallie R, Spindel ME, Lappin MR. Prevalence of selected infectious organisms and comparison of two anatomic sampling sites in shelter cats with upper respiratory tract disease. J Feline Med Surg 2008; 10: 551-7.

Vogtlin A, Fraefel C, Albini S, Leutenegger CM, Schraner E, Spiess B, Lutz H, Ackermann M. Quantification of feline herpesvirus 1 DNA in ocular fluid samples of clinically diseased cats by real-time TaqMan PCR. J Clin Microbiol 2002; 40: 519-23.

Volopich S, Benetka V, Schwendenwein I, Mostl K, Sommerfeld-Stur I, Nell B. Cytologic findings, and feline herpesvirus DNA and *Chlamydomphila felis* antigen detection rates in normal cats and cats with conjunctival and corneal lesions. Vet Ophthalmol 2005; 8: 25-32.

Von Bomhard W, Polkinghorne A, Lu ZH, Vaughan L, Vogtlin A, Zimmermann DR, Spiess B, Pospischil A. Detection of novel *chlamydiae* in cats with ocular disease. Am J Vet Res 2003; 64: 1421-8.

Walde J, Nell B, Schäfer EH, Köstlin RG. Augenerkrankungen der Katze. In: Augenheilkunde: Lehrbuch und Atlas ; Hund, Katze, Kaninchen und Meerschweinchen. Walde J, Nell B, Schäfer EH, Köstlin RG, eds. Stuttgart: Schattauer 2008: 497-696.

Wallace BL, McMillen JK, Todd JD. Canine parvovirus serum neutralizing antibody assay: assessment of factors responsible for disparity of results between tests. Cornell Vet 1983; 73:

52-7.

Walton TE, Gillespie JH. Feline viruses. VII. Immunity to the feline herpesvirus in kittens inoculated experimentally by the aerosol method. *Cornell Vet* 1970; 60: 232-9.

Wardley RC. Feline calicivirus carrier state. A study of the host/virus relationship. *Arch Virol* 1976; 52: 243-9.

Waters L, Hopper CD, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Chronic gingivitis in a colony of cats infected with feline immunodeficiency virus and feline calicivirus. *Vet Rec* 1993; 132: 340-2.

Weigler BJ, Guy JS, Nasisse MP, Hancock SI, Sherry B. Effect of a live attenuated intranasal vaccine on latency and shedding of feline herpesvirus 1 in domestic cats. *Arch Virol* 1997a; 142: 2389-400.

Weigler BJ, Babineau CA, Sherry B, Nasisse MP. High sensitivity polymerase chain reaction assay for active and latent feline herpesvirus-1 infections in domestic cats. *Vet Rec* 1997b; 140: 335-8.

Werth D, Schmeer N, Muller HP, Karo M, Krauss H. Nachweis von Antikörpern gegen *Chlamydia psittaci* und *Coxiella burnetti* bei Hunden und Katzen: Vergleich zwischen Enzymimmunttest, Immunperoxidase-Technik, Komplementbindungsreaktion und Agargelpräzipitationstest. *Zbl Vet Med B* 1987; 34: 165-76.

Wieliczko AK, Ploneczka-Janeczko K. Feline herpesvirus 1 and *Chlamydophila felis* prevalence in cats with chronic conjunctivitis. *Pol J Vet Sci* 2010; 13: 381-3.

Wilhelm S, Truyen U. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay to detect a broad range of feline calicivirus isolates. *J Virol Methods* 2006; 133: 105-8.

Wills J, Gruffydd-Jones TJ, Richmond S, Paul ID. Isolation of *Chlamydia psittaci* from cases of conjunctivitis in a colony of cats. *Vet Rec* 1984; 114: 344-6.

Wills JM (1986) Chlamydial infection in the cat. In: PhD thesis. Univ. of Bristol

Wills JM, Millard WG, Howard PE. Evaluation of a monoclonal antibody based ELISA for detection of feline *Chlamydia psittaci*. Vet Rec 1986; 119: 418-20.

Wills JM, Gruffydd-Jones TJ, Richmond SJ, Gaskell RM, Bourne FJ. Effect of vaccination on feline *Chlamydia psittaci* infection. Infect Immun 1987; 55: 2653-7.

Wills JM, Howard PE, Gruffydd-Jones T, Wathes CM. Prevalence of *Chlamydia psittaci* in different cat populations in Britain. J Small Anim Pract 1988; 29: 327-229.

Wood MM, Timms P. Comparison of nine antigen detection kits for diagnosis of urogenital infections due to *Chlamydia psittaci* in koalas. J Clin Microbiol 1992; 30: 3200-5.

Yagami K, Furukawa T, Fukui M. Serologic and virologic surveys on feline herpesvirus and feline calicivirus infections in cats for experimental use. Jikken Dobutsu 1985; 34: 241-8.

Zicola A, Saegerman C, Quatpers D, Viandier J, Thiry E. Feline herpesvirus 1 and feline calicivirus infections in a heterogeneous cat population of a rescue shelter. J Feline Med Surg 2009; 11: 1023-7.

VIII. ANHANG

Erste Untersuchung von Katzen mit Katzenschnupfen Symptomatik

Patientennummer :
Untersucher :
Datum :
Lfd. Nummer :

Tier:

Besitzer :
 Name :
 Rasse :
 Alter :
 Gewicht :
 Geschlecht :
 Kastriert :
 Letzte Impfung :
 Regelmäßig geimpft :
 Welche Impfungen :
 Haltung :
 Dauer der Symptome :
 Andere Erkrankungen :

Beschreibung der Symptome:

Evaluation der Lebensqualität und Gesundheit anhand des Karnofsky's Score*

| | |
|-------|--|
| 100 % | Normales Allgemeinbefinden, keine Beschwerden, keine Krankheitssymptome. |
| 90 % | Wenige Krankheitssymptome, normales Sozial, Fress- und Ruheverhalten. |
| 80 % | Einige Krankheitssymptome, normales Fressverhalten, Sozialverhalten gering beeinträchtigt, Komfortverhalten gering reduziert, längere Ruheperioden, normale Aktivität nur mit Anstrengung möglich, vermehrtes Schlafen. |
| 70 % | Spiel, Sozial und Komfortverhalten reduziert, Fressverhalten gering reduziert, vermehrt lethargisches Verhalten ¹ , geringgradig reduzierter Appetit. |
| 60 % | Spiel-Sozial und Komfortverhalten reduziert, braucht zeitweise spezielle Aufmerksamkeit und Pflege vom Besitzer in Bezug auf das Fressen ² |
| 50 % | Braucht regelmäßig spezielle Aufmerksamkeit und Pflege des Besitzers in Bezug auf das Fressen ³ sowie eine konstante Medikamentenbehandlung, putzt sich nicht mehr selbst |
| 40 % | Braucht regelmäßig spezielle Aufmerksamkeit und Pflege vom Besitzer in Bezug auf das Fressen ³ sowie eine konstante Medikamentenbehandlung, Lebensgefahr im Freien, Ausscheidungsverhalten reduziert, keine Stubenreinheit mehr |
| 30 % | Braucht professionelle Pflege ⁴ , Pflege zu Hause nicht länger mehr |

| | |
|------|--|
| 20 % | möglich, Klinikaufenthalt indiziert, kein selbstständiges Fressen mehr. |
| 10 % | Sehr krank, Klinikaufenthalt notwendig, lebenserhaltende Behandlung notwendig, benötigt Ösophagussonde zur Ernährung |
| 0 % | Akute Lebensgefahr, progressive Verschlechterung |
| | Tod |

¹ Reduziertes Sozial und Komfortverhalten

² Fressen meist nur bei Handfütterung

³ Fressen nur bei Handfütterung

⁴ Patient bewegt sich kaum mehr

* Der Karnofsky Index bewertet mittels einer Skala von maximal 100 % (keinerlei Einschränkung) bis 0 % (Tod) die Lebensqualität von Patienten. Der Karnofsky-Index wurde 1948 von David A. Karnofsky vorgeschlagen. Dieser Index wurde für Katzen modifiziert. Der Index ermöglicht die Beurteilung der Lebensqualität und des gesundheitlichen Wohlbefindens von Katzen. Die Objektivität ist durch eine detaillierte Klassifikation in Bezug auf das Allgemeinbefinden, wie Fressen, Schlafen und Sozialverhalten gegeben (HARTMANN & KUFFER, 1998).

Allgemeine klinische Untersuchung/Schweregrad der Erkrankung

Rektale Temperatur:

Atemfrequenz pro Minute:

Herzfrequenz pro Minute:

Ambulanter Patient ja/nein:

| | | | | |
|----------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Verhalten | 0:normal | 1: reduziert | 2: lethargisch | 3: komatös |
| Schleimhaut | 0: normal blassrosa | 1: rot | 2: blass | 3: zyanotisch |
| Atmung | 0: normal | 1: ggr. Dyspnoe | 2: mgr. Dyspnoe | 3: Maulatmung |
| Thorax Auskultation | 0: normal | 1:ggr. verschärftes Geräusch | 1: mgr. verschärftes Geräusch | 3: hgr. Verschärftes Geräusch |
| Futteraufnahme | 0: sehr gut | 1: normal | 2: reduziert | 3: Anorexie |
| Niesen | 0: kein | 1: manchmal | 2: regelmäßig | 3: oft |
| Nasenausfluss | 0: kein | 1: wenig, serös | 2: serös bis mukös | 3: hgr. mukös |
| Augenausfluss | 0: kein | 1: wenig, serös | 2: serös bis mukös | 3: hgr. mukös |
| Konjunktivitis | 0: keine | 1: ggr. | 2: mgr. | 3: hgr. |
| Keratitis | 0: keine | 1: ggr. | 2: mgr. | 3: hgr. mit Ulzerationen |
| Ulzerationen Maul/Zunge | 0: kein | 1: ein Ulcus | 2: zwei oder mehrere Ulzera | 3: Ulzera im Maul und auf der Zunge |
| Speicheln | 0: kein | 1: ggr. | 2: mgr. | 3: hgr. |
| Gingivostomatitis | 0: keine | 1: ggr. | 2: mgr. | 3: hgr. |

Probenentnahme an Tag 1

- Tupferprobenentnahme (steriler , trockener Baumwolltupfer) aus Rachen, Zunge, Konjunktiva und Nase

Unterschrift des Untersuchers: _____ Datum: _____

IX. DANKSAGUNG

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann, meiner Doktormutter, für die freundliche Aufnahme in die Klinik, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für Betreuung und Durchsicht der Arbeit.

Meiner Betreuerin, Frau Dr. Bianka Schulz möchte ich recht herzlich für die Bereitstellung des Themas, ihre fachliche Unterstützung, ihrem Beistand, ihre Geduld und ihr großes Vertrauen danken.

Besonders hervorzuheben ist mein Dank an Dr. Chris Helps für die Bearbeitung meiner Proben in seinem Institut in Bristol und der Unterstützung beim Verfassen der Veröffentlichung.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik für die gute Zusammenarbeit und die praktische und moralische Unterstützung bedanken. Vor allem auch bei Yvonne Friedl, ohne sie hätte ich die Anzahl meiner Studienpatienten nicht in diesem Zeitraum erreicht.

Bei Herrn Prof. Ralf Müller möchte ich mich recht herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung der Statistik bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Sven Reese (Institut für Anatomie) für seine schnelle Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanken.

Mein Dank gilt auch den Tierbesitzern, die bereit waren in diesem Projekt mitzumachen. Ebenso seien erwähnt die Katzen, die mehr oder weniger freiwillig die Untersuchungen und Tupferprobenentnahmen über sich ergehen ließen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und bei meinem Freund für ihre Liebe und Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit von Herzen bedanken. Hierbei vor allem bei meiner Schwester für ihre Unterstützung und Korrektur der Arbeit.